



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**ALBERTO RUBENS SIQUEIRA NOGUEIRA LEAL**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS NETS (ARMADILHAS EXTRACELULARES DE  
NEUTRÓFILOS) NA IMUNOPATOGÊNESE DA CHIKUNGUNYA**

**FORTALEZA – CE**

**2025**

**ALBERTO RUBENS SIQUEIRA NOGUEIRA LEAL**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS NETS (ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS) NA IMUNOPATOGENESE DA CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito total à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite.

**FORTALEZA – CE**

**2025**

**ALBERTO RUBENS SIQUEIRA NOGUEIRA LEAL**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS NETS (ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS) NA IMUNOPATOGENESE DA CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito total à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga  
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

---

Prof.Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha família pelo apoio nessa jornada  
e cada passo enfrentado. A Ciência por  
fazer parte da minha vida e amar o  
caminho que eu escolhi e principalmente  
a Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me sustentar com força e sabedoria ao longo de toda essa jornada.

À minha mãe e à minha avó, pelo amor incondicional, apoio diário e por nunca deixarem de acreditar em mim. À minha família, pelo suporte constante em cada fase dessa caminhada.

Aos meus colegas Renata Almeida, Thiago Rodrigues e Maria Kelva, que tornaram o percurso mais leve com companheirismo e incentivo. Aos adjacentes, que de alguma forma contribuíram com palavras, gestos ou presença, também deixo meu sincero agradecimento.

Aos professores do PPGMM das disciplinas do Mestrado, que contribuíram para o meu conhecimento na área de Microbiologia.

Meus amigos e colegas de Teresina, que me apoiaram á essa jornada de trabalho e pesquisa em outro Estado que também me acolheu de forma maravilhosa.

Também aos meus colegas de Fortaleza, que me receberam com todo carinho nas suas terras e o apoio nos Estudos.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará por ter sido minha segunda casa e me acolher de forma tão gratificante.

À professora Dra. Juliana Ueda, minha orientadora, pela orientação firme, sensível e comprometida durante todo o processo. E ao farmacêutico Raphael Rodrigues, pelo acompanhamento atencioso e dedicado, que muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês, meu muito obrigado.

## RESUMO

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são estruturas formadas por DNA, histonas e proteínas antimicrobianas, liberadas pelos neutrófilos como parte da resposta imune inata. Embora bem estudadas em infecções bacterianas, seu papel em doenças virais, como a infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV), ainda é pouco compreendido. Nas viroses, as NETs podem exercer função protetora, mas também contribuir para danos teciduais quando produzidas em excesso. A infecção por CHIKV, marcada por sintomas como febre, mialgia, exantema e principalmente artralgia prolongada, pode comprometer a qualidade de vida e, em grupos de risco, levar a desfechos graves. A falta de estudos sobre NETs na chikungunya dificulta a compreensão da resposta imune e limita o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e diagnósticas mais eficazes. Este estudo investigou a presença de marcadores das NETs durante a infecção por CHIKV ao longo do tempo em pacientes do sexo feminino com idades que variam dos 20 aos 80 anos. Os critérios de inclusão foram pacientes do sexo feminino, com idade igual ou superior a 18 anos e com sorologia IgM/IgG positiva para CHIKV. Foram excluídos indivíduos com testes sorológicos inconclusivos, gestantes, pacientes transplantados, indivíduos em uso de imunossupressores e/ou em tratamento quimioterápico, além de pacientes com outras infecções virais (como hepatites, HIV, etc.). O estudo incluiu 40 mulheres com infecção por CHIKV, avaliadas nos dias D0, D21, D90, D180 e D360, e o grupo controle foi composto por 10 mulheres saudáveis. Os marcadores de NETs (MPO (Mieloperoxidase), elastase, histona H3 citrulinada e DNA livre) foram quantificados no plasma por meio de kits ELISA tipo sanduíche e fluorometria. As análises estatísticas incluíram testes não paramétricos e correlação de Spearman, com nível de significância estabelecido em  $p < 0,05$ . O estudo demonstrou que os níveis de mieloperoxidase (MPO) apresentaram diferenças estatísticas ocorrendo uma redução entre os dias D0 e D21, e um aumento entre D21 e D360. Em relação à elastase, foram observadas diferenças significativas ocasionando uma baixa entre D0 e os dias D21 e depois uma estabilidade entre D180 e D360. Para as histonas, não foram encontradas diferenças entre os diferentes períodos analisados. Os níveis de DNA livre estavam significativamente elevados em D0, em comparação com todos os outros períodos. Não foram observadas diferenças dos níveis dos marcadores de NETs ao longo do tempo nos subgrupos de pacientes estratificados com relação a presença ou não de dor crônica, presença ou não de comorbidades e uso ou não de medicamentos. Foi observada correlação positiva entre MPO X EN (Mieloperoxidase x Elastase Neutrófila) nos períodos D0 ( $p=0,0005/r=0,5886$ ), D90 ( $p=0,0123/r=0,4515$ ) e D180 ( $p<0,0001/r=0,6464$ ). Esses achados destacam a importância de compreender o equilíbrio entre os papéis protetores e patológicos das NETs, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas direcionadas que minimizem os danos inflamatórios, preservando a imunidade antiviral durante a infecção por CHIKV.

**Palavras-chave:** Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos; Vírus Chikungunya; Patogênese; Inflamação; Imunidade inata.

## ABSTRACT

Neutrophil extracellular traps (NETs) are web-like structures composed of DNA, histones, and antimicrobial proteins released by neutrophils as part of the innate immune response. Although NETs have been extensively studied in bacterial infections, their role in viral diseases, such as Chikungunya virus (CHIKV) infection, remains poorly understood. In viral infections, NETs have an ambiguous role, being able to act as a defense mechanism, but can intensify inflammation and cause tissue damage when released excessively. CHIKV infection causes symptoms such as fever, malaise, rash, myalgia, and especially prolonged arthralgia, which can compromise quality of life. Although it is usually self-limiting, it can lead to death in at-risk groups, such as infants, the elderly, and people with comorbidities. The scarcity of studies on the role of NETs in CHIKV infection compromises the understanding of host defense mechanisms and limits the advancement of more effective therapeutic and diagnostic strategies. This study investigated the presence of NET markers during CHIKV infection over time in female patients. The study included 40 women with CHIKV infection, evaluated on days D0, D21, D90, D180 and D360, and the control group consisted of 10 healthy women. NET markers (MPO, elastase, citrullinated histone H3 and free DNA) were quantified in plasma using sandwich ELISA kits and fluorometry. Statistical analyses included nonparametric tests and Spearman correlation, with significance level set at  $p < 0.05$ . The study demonstrated that myeloperoxidase (MPO) levels showed statistically significant differences, with a reduction between days D0 and D21, and an increase between D21 and D360. Regarding elastase, significant differences were observed, with a decrease between D0 and days D21 and then stability between D180 and D360. For histones, no statistically significant differences were found between the different periods analyzed. Free DNA levels were significantly elevated on D0, compared to all other periods. No differences were observed in the levels of NET markers over time in the subgroups of patients stratified in relation to the presence or absence of chronic pain, presence or absence of comorbidities and use or absence of medications. The main results that showed significant correlation were the analysis of plasma MPO levels and a positive correlation between MPO X EN: D0, D90 and D180. These findings highlight the importance of understanding the balance between the protective and pathological roles of NETs, providing support for the development of targeted therapeutic interventions that minimize inflammatory damage while preserving antiviral immunity during CHIKV infection.

**Keywords:** Neutrophil Extracellular Traps; Chikungunya virus; pathogenesis; inflammation; innate immunity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos de liberação das NETs (NETosis).....	18
Figura 2. Análise temporal dos biomarcadores MPO, elastase, histona e DNA livre ao longo de diferentes períodos de tempo em pacientes infectadas por CHIKV. ....	36
Figura 3. Análise da concentração de marcadores de NETs em pacientes infectados com dor crônica versus sem dor crônica.....	38
Figura 4. Análise da concentração dos marcadores de NETs em pacientes com comorbidades versus pacientes sem comorbidades nos diferentes períodos de tempo. ....	38
Figura 5. Análise da concentração de marcadores de NETs em pacientes que fizeram uso de medicamentos versus pacientes que não utilizaram nos diferentes períodos de tempo. ....	40
Figura 6. Análises de correlação entre marcadores de NETs nas pacientes infectadas por CHIKV.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das pacientes por faixa etária. ....	34
Tabela 2. Características clínicas dos participantes. ....	35
Tabela 3. Comparação do controle negativo com pacientes com CHIKV. ....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- cfDNA *Cell-Free DNA (DNA livre de células)*
- CHIKV *Chikungunya Virus (Vírus Chikungunya)*
- DAMP *Damage-Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados ao Dano)*
- DNA *Ácido desoxirribonucleico*
- ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)*
- EN *Elastase Neutrofílica*
- GSDMD *Gasdermina D*
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *Peróxido de Hidrogênio*
- H3Cit *Histona H3 Citrulinada*
- HRP *Horseradish Peroxidase (Peroxidase de Raiz Forte)*
- IFN *Interferon*
- IL *Interleucina*
- LPS *Lipopolissacarídeo*
- MPO *Mieloperoxidase*
- NETs *Neutrophil Extracellular Traps (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)*
- NS1 *Nonstructural Protein 1 (Proteína Não Estrutural 1)*
- PAD4 *Peptidil Arginina Deaminase 4*
- PMA *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (Forbol 12-Miristato 13-Acetato)*
- PRR *Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconhecimento de Padrão)*
- ROS *Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)*
- SP-A *Surfactant Protein A*
- SP-D *Surfactant Protein D*
- TLR *Toll-Like Receptor (Receptor do Tipo Toll)*
- TMB *Tetrametilbenzidina*
- TNF- $\alpha$  *Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>14</b>
2.1	Características Gerais do Vírus Chikungunya (CHIKV)	14
2.2	Características clínicas da infecção por CHIKV	14
2.3	Epidemiologia da CHIK	16
2.4	Neutrófilos e a liberação de armadilhas extracelulares - NETs	17
2.4.1	Composição das NETs	20
2.4.2	Métodos laboratoriais para detecção das NETs	23
2.4.3	Papel das NETs nas infecções virais	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
4.1	População do Estudo e Descrição	28
4.2	Aspectos Éticos	28
4.3	Critérios de Inclusão e Exclusão	28
4.4	Coleta de Amostras e Dados Clínicos	29
4.5	Desenho Experimental	29
4.5.1	Mieloperoxidase	29
4.5.2	Elastase Neutrófila (EN)	30
4.5.3	Histona H3 citrulinada	31
4.6	Quantificação de marcador de NETs por Fluorimetria	32
4.6.1	DNA livre de células	32
4.7	Análises Estatísticas	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1	Características gerais das pacientes incluídas no estudo	34

5.2	Quantificação dos marcadores MPO, EN, H3cit e DNA livre ao longo do tempo em pacientes infectadas por CHIKV .....	35
5.3	Comparação do controle negativo com as pacientes com CHIKV .....	37
5.4	Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação à cronificação da dor articular .....	37
5.5	Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação à presença de comorbidades .....	38
5.6	Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação ao uso de medicamentos .....	39
5.7	Análises de correlação entre os marcadores de NETs .....	40
6	DISCUSSÃO .....	42
7	CONCLUSÃO .....	47
	REFERÊNCIAS .....	48
	ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) possui um genoma de RNA de fita simples e é um patógeno transmitido aos humanos pelos mosquitos do gênero *Aedes* que inclui espécies *A.aegypti* e *A.albopictus*. Ele é classificado como membro do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae* (Khongwichit *et al.*, 2021). Este vírus foi isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1952 e atualmente representa uma preocupação significativa para a saúde pública, sendo endêmico em regiões tropicais e subtropicais, como África, Sul da Ásia, América do Sul e América Central (Azevedo; Oliveira; Vasconcelos, 2015; Lumdsen., 1955). Os sintomas da febre Chikungunya, geralmente incluem febre alta, erupção cutânea, mialgia, cefaleia e artralgia intensa (Burt *et al.*, 2012).

Após picada do hospedeiro pelo mosquito *Aedes aegypti* infectado, o CHIKV infecta células próximas ao local de entrada, como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, iniciando seu processo de replicação (Petitdemange; Wauquier; Vieillard, 2015). Ao se ligar aos receptores celulares inatos, o vírus induz a produção de moléculas pró-inflamatórias que recrutam e ativam células do sistema imunológico para combater o patógeno (Gasque; Jaffar-Bandjee, 2015). Os receptores do tipo Toll (TLR)- 7 e TLR-8 são capazes de reconhecer o genoma viral e, à medida que o CHIKV replica seu genoma, gera um intermediário de RNA fita dupla, que pode ser detectado pelo TLR-3 (Silva; Dermody, 2017). A ativação do TLR-7 desencadeia uma cascata que leva à produção de interferon (IFN)- $\beta$ , seguido de IFN- $\alpha$ , além da estimulação de células B. Clinicamente, observa-se uma forte resposta de IFN do tipo I, com o IFN- $\alpha$  correlacionando-se com a carga viral (Silva; Dermody, 2017, Bender *et al.*, 2020). Essa resposta imune inata atrai células inflamatórias para os locais de infecção na tentativa de controlar a disseminação viral, o que pode resultar no aparecimento dos sintomas da doença à medida que os tecidos do hospedeiro são afetados e as células são destruídas (Gasque; Jaffar-Bandjee, 2015).

No processo inflamatório, um dos principais componentes é um grupo de células granulocíticas conhecido como neutrófilos. Esses neutrófilos possuem um mecanismo de defesa contra microrganismos que envolve a liberação de seu conteúdo intracelular, incluindo material genético envolto em histonas e proteínas granulares, como a elastase neutrofílica (EN) e a mieloperoxidase (MPO), no ambiente

extracelular. Esse processo é conhecido como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Embora as NETs desempenhem um papel protetor para o organismo, sua produção excessiva pode contribuir para o agravamento da doença, levando a um estado inflamatório descontrolado que causa danos sistêmicos e, em casos extremos, pode levar à morte (Zuo *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços significativos na compreensão da resposta imune à infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV), o papel das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) nesse contexto permanece pouco explorado, com apenas um estudo publicado até o momento (Hiroki *et al.*, 2020). Essa lacuna na literatura é preocupante, dado o papel das NETs no controle de patógenos e seu potencial impacto na patogênese de doenças virais. A falta de pesquisas sobre este tema limita nossa compreensão dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o CHIKV e pode dificultar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Portanto, justificam-se estudos adicionais para investigar a dinâmica das NETs na infecção pelo CHIKV, avaliar sua relação com a progressão da doença, além de explorar possíveis aplicações clínicas, como descoberta de biomarcadores ou novos alvos terapêuticos. Ampliar o conhecimento nessa área é essencial para enfrentar os desafios impostos por essa arbovirose reemergente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características Gerais do Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus da Chikungunya (CHIKV) possui genoma RNA de fita simples e é um patógeno reemergente transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. Pertencente ao gênero Alphavirus, e família *Togaviridae*, o CHIKV tem se destacado como um importante agente causador de doença em várias partes do mundo (Caglioti *et al.*, 2013). O termo “Chikungunya” significa “andar curvado”, justamente pelas fortes dores nas articulações que é um sintoma comum nos pacientes acometidos pela infecção (Powers; Logue, 2007). O CHIKV foi identificado pela primeira vez em 1952, na região sul da Tanzânia e representa um problema de saúde pública sendo endêmico em regiões tropicais e subtropicais, como a África, sul da Ásia, América do Sul e América Central (Azevedo; Oliveira; Vasconcelos, 2015; Lumdsden, 1955).

O CHIKV se destaca por sua taxa rápida de propagação em populações suscetíveis e por sua alta infectividade em regiões com ampla presença dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Honório *et al.*, 2009). Seu ciclo de transmissão pode ocorrer de 2 formas: a urbana e a silvestre, sendo o ciclo urbano o mais atual. Neste ciclo, o ser humano vai funcionar como sendo o principal reservatório do vírus e os mosquitos representam os vetores de transmissão. A transmissão vertical, ou seja, de mãe para filho, também já foi relatada, especialmente quando a infecção ocorre no final da gestação, podendo causar manifestação neonatal grave (Vasconcelos; Calisher, 2015).

### 2.2 Características clínicas da infecção por CHIKV

A infecção por CHIKV é caracterizada por sintomas como febre, mal-estar, erupções cutâneas, mialgia, sendo o mais importante a presença de artralgia. As dores articulares podem persistir por semanas ou até meses, afetando a qualidade de vida de maneira bastante impactante (Andrei; Clercq, 1993; Goupil., 2016). Embora seja uma doença autolimitada e a taxa de mortalidade seja baixa, mortes relacionadas a chikungunya já foram registradas em bebês, idosos e pessoas com doenças

preexistentes, como diabetes, doenças coronarianas, renais e hepáticas (Lima *et al.*, 2019).

Clinicamente, a infecção por CHIKV apresenta três fases distintas, sendo elas a fase aguda, subaguda e crônica. A fase aguda da doença inicia-se com febre alta ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ), cefaleia, exantema e uma possível poliartralgia com duração média de 5 a 14 dias. Em seguida, há a fase subaguda, também chamada de pós-aguda, entendendo-se do 15<sup>o</sup> ao 90<sup>o</sup> dia após o início dos sintomas, sendo caracterizada pela poliartralgia persistente, com rigidez matinal e fadiga. A fase crônica se estabelece quando os sintomas se prolongam por mais de 3 meses, podendo se prolongar por anos após infecção inicial (Tang, 2012).

A capacidade da CHIKV em desenvolver uma resposta inflamatória intensa nas articulações é uma das características mais marcantes da doença. Os monócitos migram para o local da infecção e formam, juntamente com os neutrófilos, um complexo de células infiltradas nas articulações responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF-alfa, e GM-CSF, moléculas chave para a progressão da doença (Courdec *et al.*, 2008, Gardner *et al.*, 2010).

Pesquisas mostram que entre 30% a 60% das pessoas afetadas pelo CHIKV podem desenvolver artralgia crônica, que dura meses ou até anos após a primeira infecção (Soumahoro *et al.*, 2009). Essa situação pós-viral resulta em dores nas articulações, sensação de rigidez e inchaço, principalmente nas articulações das mãos, pulsos, tornozelos e joelhos, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes.

As razões por trás da persistência da dor nas articulações depois da infecção por CHIKV são complexas e ainda pouco elucidadas. Acredita-se que uma reação inflamatória muito forte e prolongada, sustentada por IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , contribui para a cronicidade dos sintomas (Chow *et al.*, 2011). Além disso, há relatos que antígenos virais podem permanecer nas articulações, causando inflamação constante no local, parecido com o que acontece na artrite reumatoide (Hoarau *et al.*, 2010).

Lidar com a dor nas articulações após a Chikungunya é um desafio e, geralmente, requer uma equipe de profissionais de diferentes áreas. O tratamento inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides em casos mais graves e, em situações que não melhoram, pode-se considerar o uso de medicamentos que alteram o curso da doença como hidroxicloroquina ou metotrexato, principalmente quando a situação evolui para um quadro de artrite pós-viral (Goupil;

Mores, 2016). Por isso, o acompanhamento com um reumatologista é fundamental para ajudar esses pacientes, com o objetivo de controlar os sintomas e evitar danos permanentes nas articulações.

### 2.3 Epidemiologia da CHIK

A chikungunya apresenta um padrão epidemiológico significativo no Brasil, caracterizado por múltiplas ondas epidêmicas e ampla distribuição geográfica. Segundo Santos *et al.* (2024), entre 2017 e 2023, foram confirmados 487.775 casos da doença, com uma incidência média de 232,1 por 100.000 habitantes. A análise temporal revelou um aumento expressivo em 2017, seguido por uma tendência estacionária entre 2018–2019, decrescente em 2020–2021 e novamente estacionária em 2022–2023. A autocorrelação espacial foi significativa em quase todos os anos analisados, indicando padrões de distribuição espacial consistentes, com destaque para as regiões Nordeste e Norte, além de clusters emergentes no Sudeste, especialmente em Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Grabenstein e Tomar (2023) posicionam o Brasil entre os países com maior número de casos no período de 2019 a 2022. Seus dados globais destacam o Brasil como um dos epicentros da doença, junto da Índia e de países da América Latina. Segundo os autores, as áreas mais afetadas no Brasil incluem os estados do Nordeste, Mato Grosso e Rio de Janeiro, conforme mapas de risco publicados oficialmente.

Souza *et al.* (2022) reforçam que a distribuição da CHIK no Brasil entre 2013 e 2022 ocorreu em ondas, com os picos concentrando-se nos meses de fevereiro a julho. O Nordeste foi responsável por 63,5% dos casos, e a reincidência observada em 2022 se concentrou em municípios que haviam sido pouco afetados anteriormente, sugerindo que a suscetibilidade da população não exposta em ondas anteriores pode ter favorecido a retomada da transmissão. Modelos preditivos como SARIMA apresentaram alta precisão nas estimativas para 2022–2023, validando a robustez da análise epidemiológica.

Sousa *et al.* (2023) relataram a notificação de 253.545 casos confirmados em laboratório no Brasil entre 2013 e 2022, com destaque para sete grandes ondas epidêmicas, que variaram de 24.097 a 44.604 casos por ano. A maior parte desses casos ocorreu no Nordeste, sendo o Ceará o estado com o maior número de

notificações (n = 45.417). No Ceará, observou-se uma reincidência da doença em 2022, após quatro anos de baixa transmissão. Os autores identificaram uma nova linhagem viral do genótipo ECSA como associada à terceira onda epidêmica nesse estado, com maior incidência entre mulheres de 20 a 59 anos.

A associação da incidência da CHIK com indicadores de vulnerabilidade social também foi evidenciada por Santos *et al.* (2024), sendo os principais fatores correlacionados: baixa renda, moradias precárias e acesso inadequado a saneamento. Os autores destacam ainda que os jovens de 15 a 24 anos e idosos em domicílios vulneráveis apresentaram maior risco de infecção.

Argibay *et al.* (2025) analisaram especificamente a cidade de Salvador, onde foram registrados 19.129 casos entre 2016 e 2020. Os anos de 2019 e 2020 apresentaram surtos significativos, com picos epidêmicos entre abril e junho. Análises espaço-temporais revelaram aglomerados importantes e uma correlação direta entre maiores temperaturas e aumento na incidência da doença. A renda média e a densidade populacional mostraram-se negativamente associadas ao risco de chikungunya, indicando maior vulnerabilidade em áreas com menor infraestrutura urbana.

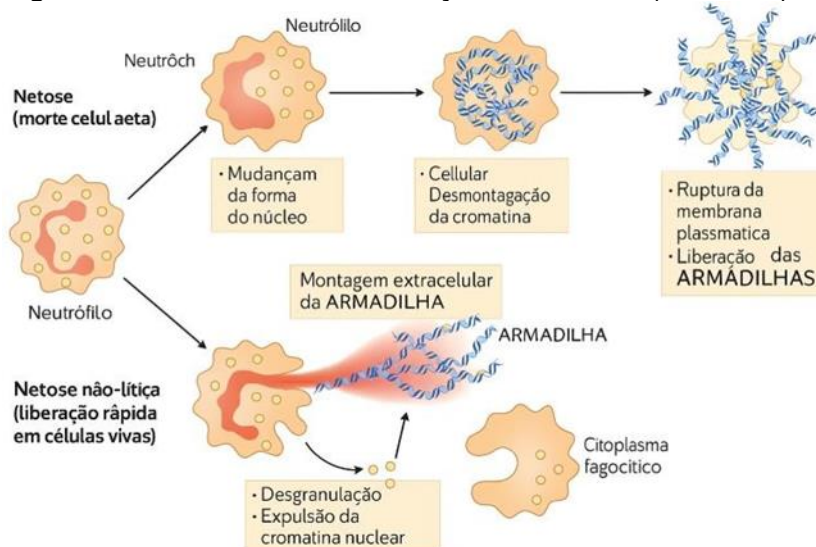
De modo geral, os estudos indicam que fatores climáticos, urbanização desordenada, desigualdades socioeconômicas e padrões espaciais de vulnerabilidade têm papel determinante na epidemiologia da chikungunya no Brasil. A persistência da doença e sua recorrência em áreas anteriormente pouco afetadas demonstram a necessidade contínua de vigilância, controle vetorial e ações integradas de saúde pública.

## **2.4 Neutrófilos e a liberação de armadilhas extracelulares - NETs**

Os neutrófilos realizam um papel central na imunidade inata e, dentre suas várias funções, tais como fagocitose e a desgranulação de mediadores, destaca-se a liberação de armadilhas extracelulares, conhecidas como NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*). Essas estruturas foram descobertas em 2004, e são compostas por filamentos de DNA associados com proteínas antimicrobianas, como elastase neutrofílica (EN), mieloperoxidase (MPO) e histonas, que são liberadas no meio extracelular para capturar, aprisionar e destruir os patógenos (Brinkmann *et al.*, 2004).

Os mecanismos de liberação das NETs tem sido alvo de diversos estudos, elucidando os processos de NETose (liberação das NETs) lítica e a não lítica ou vital (Figura 1) (Papayannopoulos, 2018).

Figura 1 Mecanismos de liberação das NETs (NETosis).



Fonte: Adaptado por Papayannopoulos (2018).

O principal mecanismo descrito para a formação das NETs é a NETose lítica, também chamada de suicida (Papayannopoulos, 2018). Esse processo envolve a morte programada do neutrófilo, que consiste em uma resposta a estímulos como lipopolissacarídeos (LPS), peptídeos bacterianos, citocinas como a IL-8 (Interleucina-8) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e compostos químicos como PMA (Burgener, 2020).

Além disso, durante a NETose lítica, observa-se a ativação de várias vias de sinalização intracelular que se resultam na produção exacerbada de ROS, principalmente via a montagem do complexo da NADPH oxidase. As ROS fazem um papel muito importante no desencadeamento de eventos subsequentes, tais como a descondensação da cromatina e o rompimento das membranas plasmática e nuclear (Amulic *et al.*, 2012; Papayannopoulos, 2018). A disfunção do citoesqueleto também é essencial nesse processo, permitindo a mistura do conteúdo nuclear e citoplasmático antes da liberação do material no meio extracelular (Yipp *et al.*, 2012). A proteína PAD4 (peptidilarginina deaminase 4) é uma enzima que se localiza no citoplasma cuja sua ativação requer uma presença de íons cálcio e ROS, elementos comuns gerados durante a sinalização envolvida na formação das NETs. Logo ativada, a PAD4 transloca-se para o núcleo, contribuindo para o aumento da

permeabilidade da membrana celular. O processo facilita a desorganização da cromatina e sua associação com proteínas vindas dos grânulos neutrofílicos. A liberação final da rede de DNA no meio extracelular ocorre através da formação de poros nas membranas nuclear e plasmática, processo que é mediado pela proteína gasdermina D (GSDMD), que é ativada por enzimas da família das endopeptidases inflamatórias (Tan; Aziz; Wang, 2021).

Outro mecanismo descrito para a formação de NETs é a chamada NETose vital ou NETose não lítica, que ocorre sem a morte imediata do neutrófilo. Nesse processo, a célula permanece com suas devidas funções após a liberação de partes do seu DNA, principalmente DNA mitocondrial ou segmentos de DNA nuclear (Yipp *et al.*, 2012). Esse processo é geralmente bem mais rápido e pode ser levado por certos estímulos como mediadores inflamatórios, citocinas e interação com patógenos. Diferentemente da NETose lítica, a vital não compromete a integridade da membrana plasmática e preserva outras funções neutrofílicas, como a fagocitose (Burgener, 2020).

Foi observado que fatores metabólicos, como o aumento da glicólise e alterações no metabolismo do colesterol, podem modular a liberação de NETs, intensificando a resposta em contextos como diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Stojkov *et al.*, 2022; Fuchs *et al.*, 2010). Esses achados reforçam a ideia de que o microambiente inflamatório e o estado metabólico do neutrófilo influenciam diretamente a NETose. Pode-se destacar que, apesar das NETs servirem de “defesa” contra agentes patogênicos, sua liberação não controlada ou persistente tem comportamento patológico resultando no agravamento da inflamação e dano tecidual em diversas condições como, doenças autoimunes, sepse, trombose, infecção viral e vários arbovírus como dengue, chikungunya e zika (Garishah *et al.*, 2021).

### 2.4.1 Composição das NETs

As NETs, como mencionado anteriormente, representam uma grandiosa estratégia do sistema imune inato, caracterizada pela liberação de uma malha de rede extracelular de DNA associada com diversas proteínas de ações antimicrobianas (Naccache; Fernandes, 2016). Essas estruturas, ao serem externalizadas, ou seja, em contato com o meio extracelular, formam uma malha pegajosa e densa que sua principal função é conter os microrganismos, impedindo sua proliferação e promover sua destruição por meio de mecanismos físicos e químicos (Yang, 2016).

Um dos principais componentes da estrutura das NETs é o DNA de origem nuclear e/ou mitocondrial, que forma uma base filamentosa e pegajosa responsável por compor uma armadilha física contra os patógenos (Dąbrowska *et al.*, 2016). Associadas à matriz de DNA, são encontradas proteínas com ações antimicrobianas, vindas principalmente dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (Saffarzadeh, 2012). Dentre as mais relevantes estão a elastase neutrofílica (NE) que destrói componentes da parede celular de bactérias; a mieloperoxidase (MPO), uma enzima que participa na geração de ROS que são letais para microrganismos; e histonas, proteínas nucleares com propriedades tóxicas para bactérias, vírus e fungos (Urban *et al.*, 2006; Papayannopoulos, 2018).

Além dessas, outras moléculas são identificadas nas NETs, destacando-se a lactoferrina, que faz o sequestro do ferro que é essencial à sobrevivência bacteriana (Bardagi *et al.*, 2021); a calprotectina com ação antifúngica e anti-inflamatória (Andrade *et al.*, 2016) e as catelicidinas, como a LL-37, que apresentam efeito bactericida direto (Papayannopoulos, 2018). A presença de enzimas proteolíticas, como gelatinase e proteinase 3, amplia a capacidade destrutiva das NETs, contribuindo tanto para a eliminação de patógenos quanto para a modulação da resposta inflamatória local (Koch *et al.*, 2021; Griffith *et al.*, 1996).

A liberação do conteúdo intracelular, por meio das NETs, pode ter implicações negativas. As histonas, por exemplo, embora tenham um papel fundamental para a atividade antimicrobiana, elas podem apresentar citotoxicidade elevada e podem danificar células do próprio hospedeiro, levando a lesões no tecido. Em certas situações de resposta exacerbada das NETs, essas estruturas podem contribuir para a inflamação crônica, formação de autoanticorpos e ativação do sistema complemento, como observado em doenças autoimunes como o lúpus

eritematoso sistêmico e na síndrome antifosfolípide (Moiana *et al.*, 2021). Além disso, as NETs fazem parte de processos como a trombose imunomediada, pois servem como uma base estrutural para agregação de plaquetas e deposição de fibrina, contribuindo para a formação de trombos. Estudos recentes associam a presença excessiva de NETs à fisiopatologia de doenças como COVID-19, onde a hiperatividade dos neutrófilos e o excesso de NETs estão ligados à lesão pulmonar aguda, tromboembolismo e disfunção de múltiplos órgãos (Middleton *et al.*, 2020).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima localizada principalmente nos grânulos primários, também chamados de azurófilos dos neutrófilos, com estrutura dimérica e massa molecular aproximada de 140 kDa. Embora sua maior concentração ocorra nos neutrófilos, também pode ser encontrada, em menor quantidade, dentro dos lisossomos de monócitos, onde corresponde a cerca de 1/3 da quantidade total presente nos neutrófilos. Sua função está basicamente relacionada à defesa antimicrobiana, já que atua na geração de ROS. A MPO utiliza peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como substrato para catalisar as reações com haletos como cloreto ( $Cl^-$ ), brometo ( $Br^-$ ) e iodeto ( $I^-$ ), originando ácidos halogenados como o ácido hipocloroso (HOCl) e radicais livres. Esses produtos têm forte capacidade oxidativa e irão contribuir para a destruição dos microrganismos ao danificar proteínas, lipídios e outras estruturas celulares (Aratani, 2018; Kargapolova *et al.*, 2021).

A MPO possui uma grande relevância para o sistema imunológico e está associado à causa ou o progresso de algumas doenças como hipertensão arterial pulmonar, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas, obesidade e aterosclerose (Khan *et al.*, 2018). Na formação das NETs, a MPO é frequentemente encontrada aderida ao DNA expelido durante a NETOsis. Essa combinação é facilitada pela natureza catiônica da MPO, que vai permitir a ligação a componentes aniônicos carregados como o do DNA extracelular. Essa afinidade eletrostática não só ajuda para a organização das NETs, como também pode influenciar nos processos intracelulares, como regulação da autofagia (Aratani, 2018; Kargapolova *et al.*, 2021).

A elastase neutrofílica (EN) é uma enzima da classe das serino proteases, altamente expressa nos neutrófilos, está armazenada principalmente nos grânulos primários, sendo uma das mais prevalentes (aproximadamente 67.000 moléculas por grânulo) e possui um peso molecular de 29,5 kD. Além de sua presença intracelular, essa protease também pode ser encontrada fixa a membrana de neutrófilos ativados, associada a proteoglicanos com os de sulfato de condroitina e sulfato de heparina. A

sua atividade proteolítica é bastante versátil, permitindo a degradação de uma ampla gama de alvos, incluindo proteínas de microrganismos, componentes estruturais da matriz extracelular, mediadores inflamatórios e proteínas que são envolvidas na coagulação. No contexto da resposta imune inata, a EN vai cooperar com outras moléculas como a MPO, o complexo da NADPH oxidase e peptídeos antimicrobianos, especialmente durante o processo da fagocitose. Além disso, é um dos elementos de estrutura das NETs, atuando na descompactação da cromatina, etapa importante para a liberação das NETs no ambiente extracelular (Rydzynska *et al.*, 2021; Voynow; Shinbashi, 2021).

A atividade da EN é modulada pelos inibidores específicos, como por exemplo a  $\alpha$ 1-antitripsina, devido ao seu potencial efeito nocivo quando está em concentrações elevadas. A desregulação dessa enzima tem sido combinada ao desenvolvimento e progresso de várias doenças inflamatórias que afetam órgãos como pulmões, rins, o sistema cardiovascular e até as neoplasias. Nas enfermidades pulmonares crônicas, a EN ajuda na disfunção do mecanismo de depuração mucociliar ao reduzir a movimentação dos cílios e intensificar a produção de mucina, o que resulta na obstrução das vias respiratórias. Além do mais, a EN é capaz de destruir componentes essenciais da matriz extracelular e proteínas envolvidas na resposta imune inata, como a lactoferrina, proteínas surfactantes (SP-A e Sp-D), opsoninas e elementos do sistema complemento e receptores fagocíticos (Voynow; Shinbashi, 2021).

Com relação as histonas, essas possuem diversos tipos (H3, H2B, H2A e H4), sendo que as do tipo H3 são proteínas pequenas (11kD a 21 kD) que possuem função de organizar o DNA dentro do núcleo celular. Elas ajudam a compactar o material genético, devido ao excesso de aminoácido carregados positivamente, como a lisina e a arginina. Durante o processo de formação das NETs, a enzima PAD4, ativada por sinais intracelulares, vai até o núcleo e modifica quimicamente a histona H3, transformando resíduos de arginina específicos em citrulina (regiões R2, R8 e R17), processo chamado de citrulinização. Essa alteração leva à perda da compactação do DNA, permitindo que ele se descondense e seja externalizado da célula, formando uma malha extracelular rica em DNA e histonas citrulinadas, especialmente a H3cit, um marcador importante da NETose (Masuda *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009).

As histonas modificadas presentes nas NETs podem induzir a produção de autoanticorpos, gerando um possível ciclo vicioso, resultando em uma inflamação

exacerbada e distúrbios inflamatórios como vasculite, trombose (Sorensen; Borregaard, 2016).

O DNA livre da célula (cfDNA – *cell free DNA*) tem papel central na atividade antimicrobiana das NETs, ou seja, ela não age apenas como uma armadilha, dificultando a movimentação dos patógenos que são capturados, mas também possuem propriedades químicas que contribuem diretamente para eliminação dos microrganismos (Monticolo *et al.*, 2020; Nagler *et al.*, 2018).

O cfDNA pode ser reconhecido como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMP), atuando como um sinal de perigo ao organismo (Monticolo *et al.*, 2020). Na década de 40, o cfDNA foi relacionado à diversas condições clínicas crônicas, como fibrose cística, doenças autoimunes e câncer. O complexo cfDNA-histonas induz a produção de citocinas pró inflamatórias, pode estimular a produção de autoanticorpos e desencadear processos citotóxicos. Essas atividades contribuem para respostas inflamatórias exageradas, bem observadas na progressão de diversas doenças crônicas inflamatórias e autoimunes (Zawrotniak; Rapala kozik, 2013).

#### **2.4.2 Métodos laboratoriais para detecção das NETs**

A identificação das NETs pode ser feita por diferentes metodologias, cada qual com seus pontos positivos, suas limitações e usos particulares, a depender do contexto, seja ele clínico ou experimental. Os métodos mais utilizados incluem técnicas de microscopia de fluorescência, testes imunológicos como o ELISA, citometria de fluxo e métodos *ex vivo* de indução de liberação de NETs *in vitro*.

A microscopia de fluorescência é uma das principais ferramentas para detectar a presença de NETs de forma direta em um determinado tecido. Nessa abordagem, o DNA é corado com substâncias fluorescentes como DAPI, Hoechst 33342 ou SYTOX Green, junto com anticorpos marcados para proteínas típicas das NETs, como a MPO, EN e a histona H3 citrulinada (H3Cit). A presença dessas proteínas no mesmo local que o DNA extracelular indica a formação de NETs. A microscopia confocal, mais sensível e precisa, pode ser usada para confirmar a estrutura tridimensional fibrilar característica das NETs (De buhr, 2016; Brinkmann *et al.*, 2004).

O ensaio de ELISA é muito utilizado para detectar as NETs de forma indireta, principalmente em amostras clínicas, como soro e plasma. Ele permite medir

a quantidade de complexos específicos, como MPO-DNA, ENDNA ou H3Cit-DNA, sendo útil para avaliar a presença de NETs em doenças inflamatórias, infecciosas ou autoimunes (Kasprzycka *et al.*, 2019). Esse método, por ter um caráter quantitativo, é especialmente útil para estudos clínicos e epidemiológicos, embora não forneça informação morfológica direta sobre as estruturas das NETs.

A citometria de fluxo também foi adaptada para analisar NETs, com protocolos que identificam neutrófilos em NETose por meio de marcação intracelular e detecção de alterações na membrana e liberação de DNA. Apesar de não permitir a observação direta das fibras extracelulares, a técnica possibilita análise em larga escala e com alto rendimento (Gavillet *et al.*, 2015).

Uma técnica importante na pesquisa experimental é a indução e visualização *ex vivo* de NETs, na qual há um isolamento neutrófilos do sangue periférico, geralmente por gradiente de densidade (como Ficoll-Paque), e cultivo dessas células em placas tratadas para aderência. Após a aderência, os neutrófilos são estimulados *in vitro* com agentes químicos como PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), ionóforos de cálcio (como A23187), LPS ou patógenos vivos. Após a incubação, as NETs formadas são fixadas e analisadas por microscopia de fluorescência com colorações específicas para DNA e proteínas associadas às NETs (Hiroki *et al.*, 2020). Essa abordagem permite uma análise visual precisa da morfologia das NETs e possibilita estudos sobre os mecanismos de sinalização envolvidos em sua formação.

Ademais, técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência em tecidos podem ser usadas para detectar NETs *in situ*, em amostras de biópsias ou autópsias, identificando marcadores específicos como H3Cit, NE e MPO, que estão juntos com DNA extracelular (Lande *et al.*, 2011).

### **2.4.3 Papel das NETs nas infecções virais**

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) exercem uma função essencial na imunidade inata, servindo como uma forma de proteção contra microrganismos invasores. Tal processo se mostra especialmente relevante em quadros infecciosos onde a fagocitose não consegue eliminar de forma eficiente o

patógeno, ajudando significativamente no combate a microrganismos extracelulares. Atualmente, somente um estudo investigou o papel das NETs no contexto da chikungunya. Hiroki e colaboradores (2020) mostraram no seu estudo que a indução das NETs contribui de forma significativa para o combate a infecção por CHIKV. Neste trabalho, foi observado que a infecção de neutrófilos murinos induz NETose por meio da ativação do TLR7 e produção de espécies reativas de oxigênio. In vitro, NETs liberadas por neutrófilos estimularam a captura e neutralização do vírus. In vivo, a inibição das NETs aumentou a suscetibilidade à infecção em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup>. Em humanos, níveis elevados de NETs correlacionaram-se com maior carga viral, sugerindo sua participação também em infecções naturais.

Entretanto, outros estudos mostram que as NETs, embora cruciais para a resposta imune inicial, nem sempre conseguem controlar certos tipos de infecção, principalmente quando os invasores desenvolvem mecanismos de evasão. Bactérias como *S.aureus* e *S. pneumoniae*, por exemplo, liberam enzimas que destroem o DNA das NETs, abrindo caminho para que se livrem dessas armadilhas e a infecção prossiga (Beiter *et al.*, 2006; Berends *et al.*, 2010). Em situações críticas como a sepse, a produção excessiva de NETs falha em eliminar os agentes infecciosos e, surpreendentemente, acaba prejudicando os tecidos e comprometendo o funcionamento dos órgãos, piorando o quadro (Xu *et al.*, 2009).

Na infecção pelo vírus da dengue (DENV), estudos revelam uma participação complexa das NETs. De acordo com Garishah *et al.* (2021), os níveis de NETs estão aumentados principalmente nas fases iniciais da doença, sendo que sua formação ocorre de maneira predominantemente independente da NADPH oxidase, uma via clássica de produção de ROS. A ativação de plaquetas, especialmente pela proteína não estrutural NS1 do DENV, tem papel central nesse processo. Essas NETs, apesar de possuírem atividade antiviral, também estão associadas a efeitos adversos, como aumento da permeabilidade vascular e lesão endotelial, fatores que contribuem para as manifestações clínicas graves da doença. Em concordância com os achados anteriores, Cucunawangsih *et al.* (2024) identificaram, por meio de análises transcriptômicas e sorológicas, que pacientes com formas graves da dengue, como a febre hemorrágica, apresentam níveis significativamente elevados da histona H3 citrulinada (CitH3), um marcador de NETose. Esses níveis foram inversamente correlacionados com a contagem de plaquetas, sugerindo que a formação exacerbada

de NETs pode contribuir para a trombocitopenia e para a gravidade clínica da infecção, sobretudo em casos de infecção secundária.

No contexto da infecção pelo vírus Zika (ZIKV), Santos *et al.* (2023) observaram que o vírus, diferentemente do CHIKV, apresenta uma estratégia de evasão imune ao inibir a formação de NETs induzida por estímulos como PMA e CXCL8. Entretanto, a proteína NS1 do ZIKV, quando isolada, foi capaz de induzir NETose de forma independente da produção de ROS e via ativação do receptor TLR4. Essas NETs, ao serem liberadas, demonstraram toxicidade significativa em células nervosas periféricas, como neurônios e células de Schwann, causando degeneração neuronal, desmielinização e morte celular. Tais achados sugerem que a formação de NETs pode estar implicada na patogênese de complicações neurológicas associadas ao ZIKV, como a Síndrome de Guillain-Barré. A MPO foi identificada como um dos principais componentes tóxicos dessas NETs, e sua inibição reduziu significativamente os efeitos deletérios observados, o que aponta para potenciais alvos terapêuticos.

Além desses vírus específicos, outros estudos, como o de Schönrich e Raftery (2016), discutem o envolvimento das NETs em infecções por diferentes vírus, como HIV-1, vírus sincicial respiratório, vírus Sendai e poxvírus. Esses autores destacam que a formação de NETs pode ocorrer tanto por ativação direta dos neutrófilos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) quanto por mecanismos indiretos mediados por citocinas inflamatórias (como IL-8 e IFN tipo I) ou pela ativação plaquetária. As NETs exercem atividade antiviral não apenas por capturar fisicamente as partículas virais, impedindo sua disseminação, mas também por meio de ações citotóxicas diretas, promovidas por seus componentes moleculares. Contudo, a formação descontrolada dessas estruturas pode resultar em efeitos adversos, como dano endotelial, ativação do sistema de coagulação e lesão tecidual, especialmente em infecções virais sistêmicas, como as causadas por hantavírus.

Deste modo, entende-se que as NETs desempenham um papel duplo nas infecções virais. Por um lado, funcionam como mecanismos de defesa importantes ao restringir a replicação e a propagação dos diferentes vírus. Por outro, sua produção exacerbada ou prolongada pode agravar o quadro clínico, contribuindo para processos inflamatórios intensos e danos a tecidos sensíveis, como o endotelial e o nervoso.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel das NETs na imunopatogênese da infecção pelo CHIKV em pacientes do sexo feminino.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever as características sociodemográficas e clínicas de pacientes infectados por CHIKV;
- Avaliar quantitativamente os níveis dos marcadores de NETs (MPO, elastase neutrofílica, histona citrulinada e DNA livre) em pacientes infectadas por CHIKV ao longo dos períodos D0, D21, D90, D180 e D360.
- Investigar a relação temporal entre os níveis séricos de marcadores de NETs e a ocorrência de dor crônica, presença de comorbidades e uso de medicamentos.
- Correlacionar os marcadores de NETs entre si ao longo dos diferentes períodos de tempo.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 População do Estudo e Descrição**

Trata-se de um estudo longitudinal, retrospectivo, que envolveu a coleta de informações sociodemográficas e análise de amostras biológicas coletadas entre os anos de 2021 e 2024. Um total de 40 pacientes do sexo feminino, com infecção confirmada por Chikungunya vírus (sorologia positiva para IgM/IgG) foram selecionadas em pontos temporais classificados como D0, D21, D90, D180 e D360. Esses pontos correspondem a períodos específicos de acompanhamento para coleta de dados, referindo-se aos dias 0, 21, 90, 180 e 360 após a avaliação inicial das pacientes. Além disso, 10 mulheres saudáveis foram selecionadas como grupo controle.

As pacientes com infecção por CHIKV foram recrutadas na Unidade de Atenção Primária à Saúde (UAPS) Oliveira Pombo, onde funciona o Ambulatório de Arboviroses coordenado pelo Prof. Dr. Luciano Pamplona. As voluntárias saudáveis foram recrutadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), vinculado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **4.2 Aspectos Éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) (CAAE: 75466723.2.0000.5054). As amostras foram coletadas apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelas participantes.

### **4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Os critérios de inclusão foram: pacientes do sexo feminino, com idade igual ou superior a 18 anos e com sorologia IgM/IgG positiva para CHIKV. Foram excluídos indivíduos com testes sorológicos inconclusivos, gestantes, pacientes transplantados,

indivíduos em uso de imunossupressores e/ou em tratamento quimioterápico, além de pacientes com outras infecções virais (como hepatites, HIV, etc.).

#### **4.4 Coleta de Amostras e Dados Clínicos**

Foram coletadas amostras de sangue periférico (10 mL) por meio de punção venosa das pacientes nos períodos D0, D21, D90, D180 e D360. Após a coleta, os tubos foram centrifugados, e o plasma foi alíquotado e armazenado em tubos do tipo Eppendorf, em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até a quantificação dos marcadores. Para evitar a degradação das amostras devido a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, foram preparadas alíquotas de trabalho a partir das amostras originais.

#### **4.5 Desenho Experimental**

A quantificação dos marcadores de NETs (MPO, EN e H3cit) no plasma foi realizada utilizando kits de ELISA tipo sanduíche e as leituras foram realizadas utilizando o leitor de microplacas SmartReader™ 96 da Accuris Instruments™. Já o DNA livre foi quantificado por fluorometria com kits da marca Invitrogen™ Thermo Fisher e detectado utilizando fluorímetro Qubit® 2.0.

##### **4.5.1 Mieloperoxidase**

Para medir a quantidade de MPO humana nas amostras, utilizou-se o kit comercial *Myeloperoxidase Human Instant ELISA™* (BMS2038INST) da *Invitrogen Thermo Fisher Scientific*. Para isso, as amostras foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:50, misturando 490  $\mu\text{L}$  do diluente com 10  $\mu\text{L}$  da amostra. Essa mistura foi homogeneizada utilizando um vórtex (Bionex) e uma minicentrífuga UniSpin (Uniscience), por 10 segundos cada, antes de serem colocadas na placa. Os 96 poços da microplaca, fornecidos no kit, já continham anticorpos monoclonais específicos para MPO humana, além do conjugado com biotina, o complexo estreptavidina-HRP e o diluente da amostra, todos em forma liofilizada. Os poços da curva padrão também continham os padrões liofilizados (em duplicata) em concentrações que variavam de

10.000 a 156 pg/mL. O tampão de lavagem concentrado 10x (solução salina tamponada com fosfato com 1% de detergente Tween® 20) foi diluído em 475 mL de água destilada.

O procedimento começou com a adição de 150 µL de água destilada nos poços da curva padrão e do branco, e 100 µL de água destilada nos poços das amostras, para reconstituir os reagentes liofilizados. Em seguida, foram adicionados 50 µL das amostras diluídas (1:50) nos poços correspondentes. A placa foi então selada e incubada em temperatura ambiente (18 a 25°C), a 200 rpm, por três horas em um shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP. Após a incubação, realizamos a lavagem manual dos poços, adicionando 350 µL de tampão de lavagem em cada poço, repetindo o processo quatro vezes. Após cada lavagem, o conteúdo dos poços foi descartado na pia e os resíduos de tampão foram removidos da placa com leves batidas em papel toalha. Adicionamos 100 µL da solução de substrato cromogênica Tetrametilbenzidina (TMB) em todos os poços e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos, protegida da luz. Por fim, adicionamos 100 µL da solução de parada (ácido fosfórico 1M) em cada poço e a placa foi lida em um leitor de absorvância, utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.5.2 Elastase Neutrófila (EN)**

Para determinar a quantidade de elastase neutrófila (EN) humana nas amostras de plasma, utilizou-se o kit comercial *Human PMN-Elastase ELISA™* (BMS269) da *Invitrogen Thermo Fisher Scientific*. Antes de começar, as amostras passaram por um processo de descongelamento e diluição (1:100) dividido em duas fases: inicialmente, combinou-se 90 µL do diluente com 10 µL da amostra; em seguida, foram adicionados 450 µL do diluente a 50 µL da amostra. As amostras diluídas foram agitadas em um vórtex (Bionex) e, posteriormente, em uma minicentrífuga UniSpin (Uniscience), durante 10 segundos em cada etapa, antes de serem aplicadas na placa. Os 96 poços da microplaca, fornecidos no kit, continham anticorpos específicos para a elastase de neutrófilos humanos. Para criar a curva padrão, realizou-se diluições seriadas do padrão liofilizado (10 ng/mL), que foi reconstituído com 2000 µL do diluente da amostra, de forma que a curva padrão variasse de 10 a 0,16 ng/mL. Além do padrão, o kit forneceu um controle de alta concentração, que foi reconstituído em 1000 µL do diluente. O tampão de lavagem

concentrado 10x (solução salina tamponada com fosfato contendo 1% de detergente Tween® 20) foi diluído em 450 mL de água destilada.

O procedimento teve início com a aplicação de 100 µL dos padrões (em duplicata), 100 µL de diluente no branco (em duplicata) e 100 µL das amostras diluídas a 1:100, juntamente com o controle, em seus respectivos poços. A placa foi devidamente selada e incubada à temperatura ambiente, a 900 rpm, durante uma hora, utilizando um shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP. Após o período de incubação, realizou-se a lavagem dos poços com a lavadora de Microplacas Wellwash Versa (Figura 13), aplicando 350 µL de tampão de lavagem em cada poço, por quatro vezes. A cada lavagem, o conteúdo dos poços foi aspirado pela lavadora e, após a última lavagem, os resíduos de tampão da placa foi removido, secando-a com batidas em papel toalha. Em seguida, adicionou-se 150 µL do conjugado-HRP em todos os poços, a placa foi selada e a incubada à temperatura ambiente, a 900 rpm, por uma hora, utilizando o shaker. Após a incubação, a placa foi lavada mais quatro vezes, conforme descrito anteriormente, e adicionamos 200 µL de TMB em todos os poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente, por 20 minutos, protegida da luz. Finalmente, adicionamos 50 µL de solução de parada (ácido clorídrico 2M) em cada poço e realizou-se a leitura da placa com um leitor de absorvância, utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.5.3 Histona H3 citrulinada**

Para quantificar a histona H3 citrulinada nas amostras de plasma, utilizou-se o kit comercial *Citrullinated Histone H3* (Clone 11D3) ELISA™ (501620) da *Cayman Chemical*. Antes de tudo, as amostras foram descongeladas e diluídas (1:2) usando 60 µL do diluente e 60 µL da amostra. Após diluição, as amostras foram homogeneizadas em vórtex (Bionex) e minicentrífuga UniSpin (Uniscience), por 10 segundos cada, e então adicionadas na placa. Os 96 poços da microplaca do kit já vinham sensibilizados com anticorpos monoclonais específicos para histona H3 citrulinada nos resíduos R2, R8 e R17. Diluiu-se o tampão de ensaio concentrado (10x) com 90 mL de água, adicionando 100 µL do estabilizante polissorbato 20. Para criar a curva padrão, realizou-se diluições seriadas do padrão liofilizado (500 ng/mL), que foi reconstituído com 2 mL do tampão de ensaio, gerando um intervalo de 10 - 0,15 ng/mL. O tampão de lavagem concentrado 400x foi diluído em 1 L de água

destilada. O conjugado-HRP concentrado (10x) foi diluído usando 1,2 mL do conjugado e 10,8 mL do tampão de ensaio. Iniciou-se o ensaio adicionando 100 µL dos padrões (em duplicata), 100 µL de tampão de ensaio no branco (em duplicata) e 100 µL das amostras diluídas 1:2 nos poços. A placa foi selada e incubada à temperatura ambiente, a 300 rpm, por duas horas, em shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP.

Após a incubação, os poços foram lavados com a lavadora de Microplacas Wellwash Versa, utilizando 300 µL de tampão de lavagem em cada poço, cinco vezes. Após cada lavagem, o conteúdo foi aspirado pela lavadora e, após a última, secamos os resíduos da placa com batidas em papel toalha. Adicionou-se 100 µL do conjugado-HRP nos poços, a placa foi selada e incubada à temperatura ambiente a 300 rpm por uma hora em shaker. Após a incubação, lavou-se a placa mais cinco vezes como antes e adicionou-se 100 µL de TMB em todos os poços. A placa foi incubada em shaker, à temperatura ambiente, por 30 minutos, protegida da luz. Por fim, adicionou-se 100 µL de solução de parada em cada poço e lemos a placa no leitor de absorvância, usando o comprimento de onda de 450 nm.

## **4.6 Quantificação de marcador de NETs por Fluorimetria**

### **4.6.1 DNA livre de células**

Para determinar a quantidade de cfDNA nas amostras de plasma, utilizou-se a técnica de fluorimetria. Nesse método, adicionou-se o corante fluorescente Qubit® dsDNA HS Reagent (Componente A) ao plasma. Em seguida, usando um fluorômetro, detectou-se a fluorescência produzida, que é diretamente proporcional à quantidade de cfDNA no plasma testado. Utilizou-se o kit Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kits (Q33230, Q33231) da Invitrogen Thermo Fisher Scientific, ideal para quantificar DNA de fita dupla livre com sensibilidade alta (1 ng/mL a 500 ng/mL). O fluorímetro utilizado foi o Qubit 2.0®, do mesmo fabricante do kit.

Inicialmente, preparou-se a solução de trabalho diluindo o corante fluorescente 1:200 com o tampão do kit. Assim, para os 80 tubos (78 amostras + 2 padrões de calibração do kit), foi pipetado 15.920 µL de tampão e 80 µL do reagente em um tubo falcon. Agitou-se a solução de trabalho no vórtex (Bionex) por 10 segundos e usou-se para preparar 200 µL de solução final, adicionando os padrões

(Qubit® dsDNA HS Standard #1 e #2) e as amostras. Os padrões serviram para calibrar o equipamento; o padrão #1 tinha concentração de 0 ng/μL e o padrão #2, 10 ng/μL.

Dessa forma, foram adicionados 190 μL de solução de trabalho e 10 μL de padrão nos tubos de padrões e 198 μL de solução de trabalho e 2 μL de amostra nos tubos de amostras, em eppendorfs específicos (Axygen® PCR-05-C tubes). Agitou-se os 80 tubos no vórtex e minicentrífuga UniSpin (Uniscience) por 3 segundos. Após dois minutos de repouso, os tubos foram lidos no Qubit 2.0®. Os valores foram emitidos em ng/μL e o equipamento calculou as concentrações, conforme a diluição e o volume da amostra, usando a fórmula: valor emitido x 200/volume da amostra.

#### 4.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* (versão 8.0.1). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e como a maioria das variáveis apresentou distribuição não normal, utilizaram-se testes não paramétricos. As variáveis contínuas foram expressas em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Para comparações entre diferentes tempos (D0, D21, D90, D180 e D360), aplicou-se o teste de Friedman com pós-teste de Dunn. Entre dois grupos independentes, como dor crônica vs. sem dor, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, e para mais de dois grupos independentes, foi adotado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

As variáveis categóricas foram expressas em frequência absoluta e relativa, com análise pelo teste do qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. A correlação entre os marcadores de NETs foi avaliada pelo teste de Spearman. Em todas as análises, considerou-se um nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características gerais das pacientes incluídas no estudo

A tabela 1 apresenta o número de pacientes em diferentes faixas etárias divididas nas seguintes categorias: 20–29 anos, 30–39 anos, 40–49 anos, 50–59 anos, 60–69 anos, 70–79 anos e 80 anos ou mais. A faixa etária de 50–59 anos representou o maior percentual de pacientes, correspondendo a 25% do total da amostra. O segundo maior grupo foi o de 30–39 anos, com 17,5% da amostra. A distribuição mostra que tanto os grupos de idade mais jovem (20–29 e 30–39 anos) quanto os grupos mais idosos (60–69 e 70–79 anos) compuseram uma proporção menor da amostra.

Tabela 1. Distribuição das pacientes por faixa etária.

Faixa etária	Número absoluto	Porcentagem (%)
20 - 29 anos	6	15.0%
30 - 39 anos	7	17.5%
40 - 49 anos	4	10.0%
50 - 59 anos	10	25.0%
60 - 69 anos	5	12.5%
70 - 79 anos	3	7.5%
≥ 80 anos	1	2.5%

Fonte: Autor (2025).

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos dados clínicos dos pacientes avaliados, incluindo presença de dor, comorbidades e uso de medicamentos. Observou-se que a maioria relatou dor (55%, n=22), enquanto 40% (n=16) não referiram essa queixa e 5% (n=2) tiveram registros inválidos. Em relação às comorbidades, 45% (n=18) apresentavam ao menos uma condição clínica associada, como HAS, DM, DAC ou Asma, ao passo que 55% (n=22) não possuíam comorbidades registradas. Quanto ao uso de medicamentos, a grande maioria dos

pacientes (90%, n=36) fazia uso de algum fármaco, com predominância de analgésicos como Dipirona, AINEs, Paracetamol e opioides, enquanto apenas 10% (n=4) não utilizavam medicamentos.

Tabela 2. Características clínicas dos participantes.

Variável	Categoria	Número absoluto (n)	Porcentagem (%)
<b>Presença de dor</b>	Sim	22	55.0%
	Não	16	40.0%
	Dado inválido	2	5.0%
<b>Comorbidades</b>	Sim	18	45.0%
	Não	22	55.0%
<b>Uso de medicamentos</b>	Sim	36	90.0%
	Não	4	10.0%

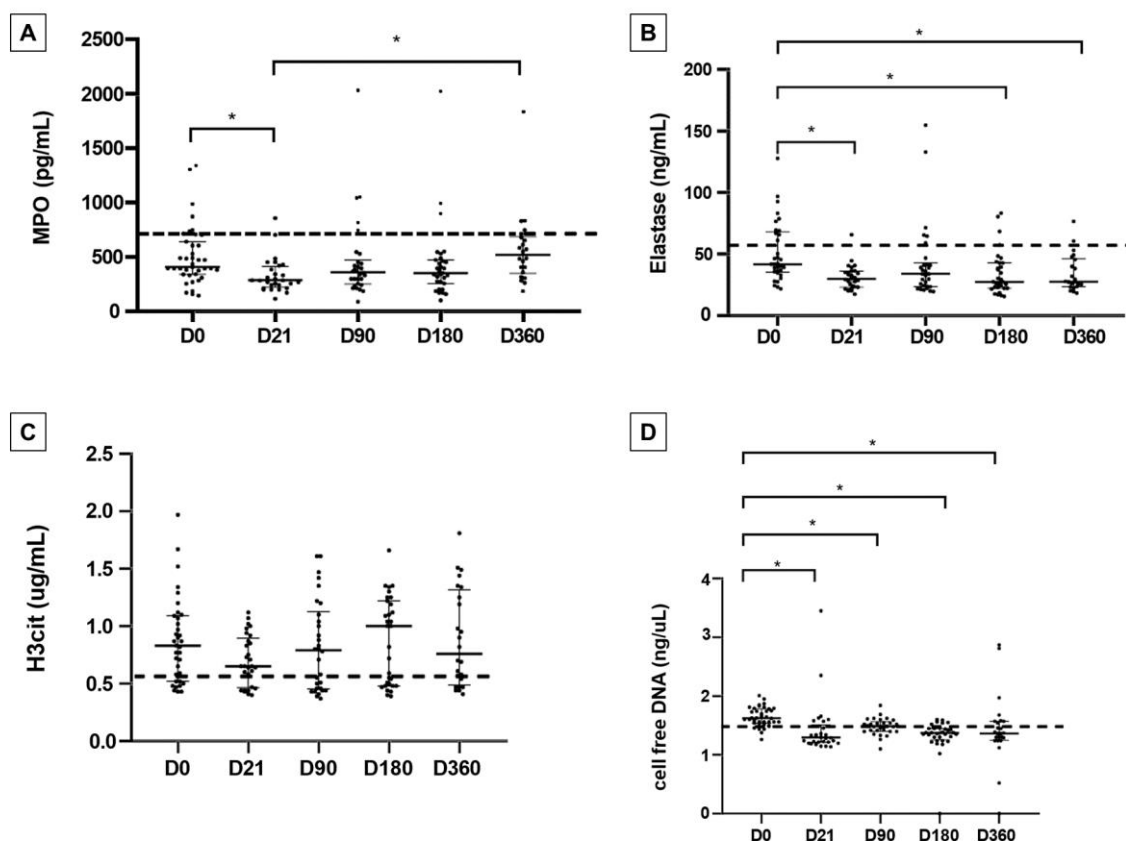
Fonte: Autor (2025).

## 5.2 Quantificação dos marcadores MPO, EN, H3cit e DNA livre ao longo do tempo em pacientes infectadas por CHIKV

A quantificação dos principais marcadores associados à formação das NETs, (MPO, Elastase, H3cit e DNA livre), foram realizados ao longo de diferentes períodos do curso da infecção por CHIKV (D0, D21, D90, D180 e D360). Os resultados mostrados na Figura 2 permitem avaliar as diferenças concentrações ao longo do tempo dos biomarcadores.

Com base nos dados obtidos, a análise dos níveis plasmáticos de MPO, (Figura 2A) ao longo do curso da infecção por CHIKV, revelou variações estatisticamente significativas. Observou-se uma redução significativa entre o dia 0 (D0, mediana 408,5 pg/mL) e o dia 21 (D21, mediana 285,8 pg/mL). Comparando-se os períodos D21 (mediana 285,8 pg/mL) e D360 (mediana 521,5 pg/mL), uma elevação significativa nos níveis de MPO foi observado.

Figura 2. Análise temporal dos biomarcadores MPO, elastase, histona e DNA livre ao longo de diferentes períodos de tempo em pacientes infectadas por CHIKV.



Legenda: (A) Quantificação de mieloperoxidase (MPO) ao longo do tempo. (B) Quantificação de elastase neutrofílica (C) Quantificação de histona citrulinada (H3Cit). (D) Quantificação de DNA livre. (\*  $p < 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). A linha tracejada refere-se à mediana de concentração do grupo controle (n=10).

Fonte: Autor (2025).

Com relação à elastase neutrofílica (Figura 2B), foi observado níveis diminuídos nos períodos D21 (29,88 ng/mL), D180 (27,41 ng/mL) e D360 (27,57 ng/mL) em relação ao período D0 (41,76 ng/mL).

Os níveis de histona citrulinada (H3Cit) (Figura 2C) não apresentaram diferenças significativas entre os tempos avaliados.

Na análise dos níveis de DNA livre - cfDNA (Figura 2D) ao longo do tempo observou-se que os níveis que os períodos de D21 (1,295 ng/uL), D90 (1,49 ng/uL), D180 (1,370 ng/uL) e D360 (1,365 ng/uL) apresentaram níveis reduzidos de DNA livre em comparação com o período D0 (1,625 ng/uL).

### 5.3 Comparação do controle negativo com as pacientes com CHIKV

Além do mais, foi observado a comparação do controle negativo com as pacientes com CHIKV, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Comparação do controle negativo com pacientes com CHIKV.

	CN	D0	D21	D90	D180	D360
<b>MPO</b>	710,2	408,5	285,8	360,5	353,5	521,5
<b>(pg/mL)</b>		<b>p= 0,0004*</b>	<b>p= 0,0004*</b>	<b>P&lt;0,0001*</b>	<b>P&lt;0,0001*</b>	<b>P=0.0001*</b>
<b>EN</b>	57,32	41,76	29,88	33,96	27,41	<b>27,57</b>
<b>(ng/mL)</b>		<b>P=0.0019*</b>	P=0.0055*	<b>P&lt;0.0001*</b>	<b>P=0.0005*</b>	<b>P=0.0053*</b>
<b>H3cit</b>	0,57	0,83	0,65	0,79	1	0,76
<b>(ug/mL)</b>		<b>P=0.0119*</b>	P=0.0646	<b>P=0.0060*</b>	<b>P=0.0046*</b>	<b>P=0.0166*</b>
<b>DNA livre</b>	1,625	1,295	1,49	1,37	1,365	1,485
<b>(ng/mL)</b>		<b>P&lt;0.0001*</b>	<b>P=0.6095*</b>	<b>P&lt;0.0001*</b>	<b>P=0.0009*</b>	<b>P=0.1483</b>

Legenda: Os níveis de MPO, elastase neutrofílica (EN), histona H3 citrulinada (H3cit) e DNA livre circulante (cfDNA) foram quantificados em diferentes períodos de tempo nas pacientes infectadas pelo CHIKV e comparados do ao grupo controle (CN). Os valores de p referem-se à comparação entre a mediana da concentração cada período de tempo e o grupo controle, sendo considerados estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ . Para os testes estatísticos utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Fonte: Autor (2025).

Com relação à MPO, observou-se que os níveis desse marcador estiveram significativamente diminuídos em relação ao grupo controle (Tabela 3). O mesmo padrão foi observado para a elastase neutrofílica e para o DNA livre, onde o grupo de pacientes infectadas apresentou níveis menores em relação ao grupo controle.

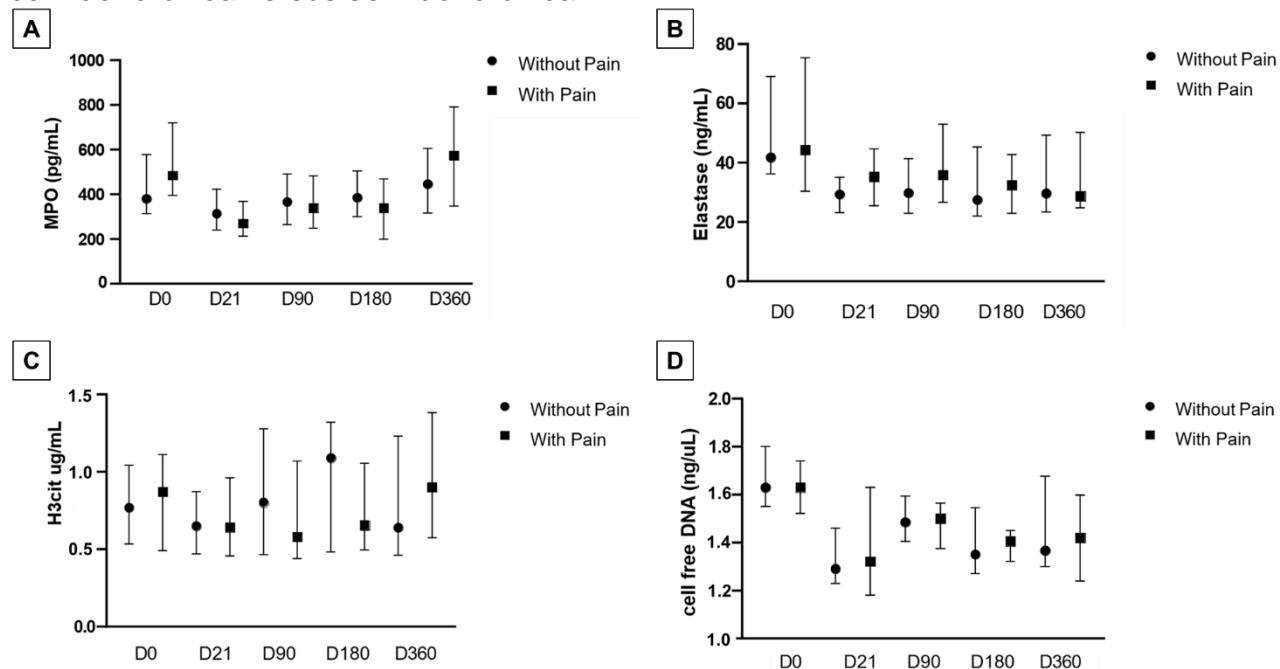
Por outro lado, ao se comparar a concentração de histona citrulina H3cit, as pacientes infectadas por CHIKV apresentaram níveis elevados nos períodos de D0, D90, D180 e D360 em comparação ao grupo controle (Tabela 3).

### 5.4 Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação à cronificação da dor articular

De acordo com os resultados mostrados na Figura 3, ao se estratificar o grupo de casos em pacientes com presença de dor crônica (n=22) e pacientes sem

dor crônica (n=16), não foram observadas diferenças na concentração dos marcadores de NETs nos diferentes períodos de tempo.

Figura 3. Análise da concentração de marcadores de NETs em pacientes infectados com dor crônica versus sem dor crônica.



Legenda: (A) Concentração de mieloperoxidase (MPO, pg/mL); (B) Concentração de elastase neutrofílica (ng/mL); (C) Concentração de histona 3 citrulinada; (D) Concentração de DNA livre (ng/ $\mu$ L). Os valores estão representados pela mediana e intervalo interquartil. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para as comparações entre os dois grupos, em um determinado período de tempo.

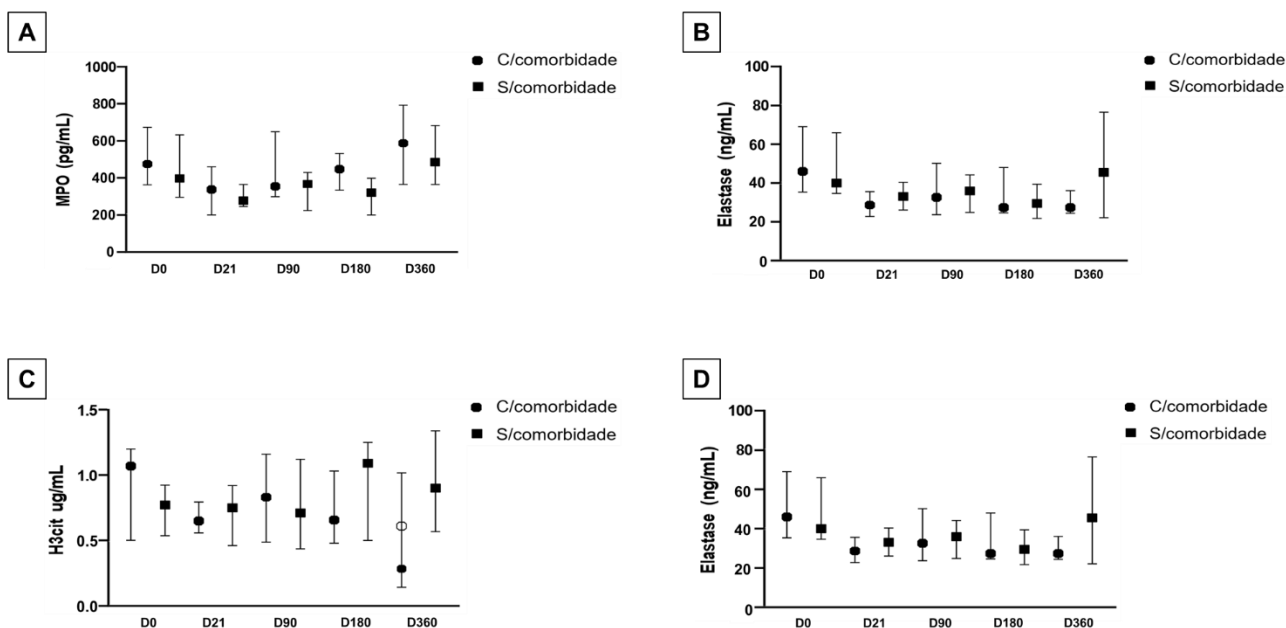
Fonte: Autor (2025).

## 5.5 Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação à presença de comorbidades

Com relação às comorbidades, as pacientes foram avaliadas em relação a presença de diabetes, hipertensão arterial, asma, doença arterial coronariana, doença pulmonar obstrutiva crônica e acidente vascular cerebral.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 4, ao se estratificar o grupo de casos em pacientes com presença de comorbidades (n=18) e pacientes sem comorbidades (n=22), não foram observadas diferenças na concentração dos marcadores de NETs nos diferentes períodos de tempo.

Figura 4. Análise da concentração dos marcadores de NETs em pacientes com comorbidades versus pacientes sem comorbidades nos diferentes períodos de tempo.



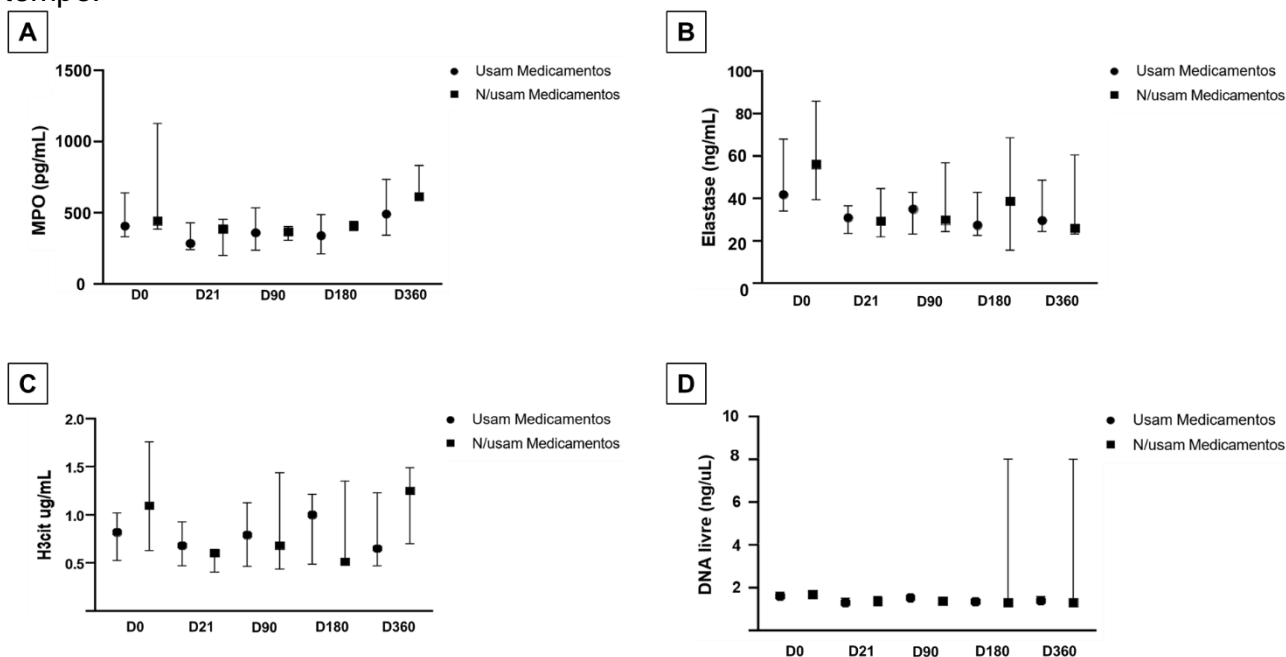
Legenda: (A) Concentração de mieloperoxidase (MPO, pg/mL); (B) Concentração de elastase neutrofílica (ng/mL); (C) Concentração de histona 3 citrulinada; (D) Concentração de DNA livre (ng/ $\mu$ L). Os valores estão representados pela mediana e intervalo interquartil. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para as comparações entre os dois grupos, em um determinado período de tempo. Fonte: Autor (2025).

## 5.6 Avaliação dos marcadores de NETs em pacientes infectadas por CHIKV e estratificadas em relação ao uso de medicamentos

Com relação às comorbidades e o uso de medicamentos, as pacientes foram avaliadas em relação ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opioides ou fármacos como dipirona, paracetamol, nimesulida, pregabalina e corticosteroide (dexametasona).

De acordo com os resultados mostrados na Figura 5, ao se estratificar o grupo de casos em pacientes que faziam uso de medicamentos (n=36) e pacientes sem uso de medicamentos (n=4), não foram observadas diferenças na concentração dos marcadores de NETs nos diferentes períodos de tempo.

Figura 5. Análise da concentração de marcadores de NETs em pacientes que fizeram uso de medicamentos versus pacientes que não utilizaram nos diferentes períodos de tempo.

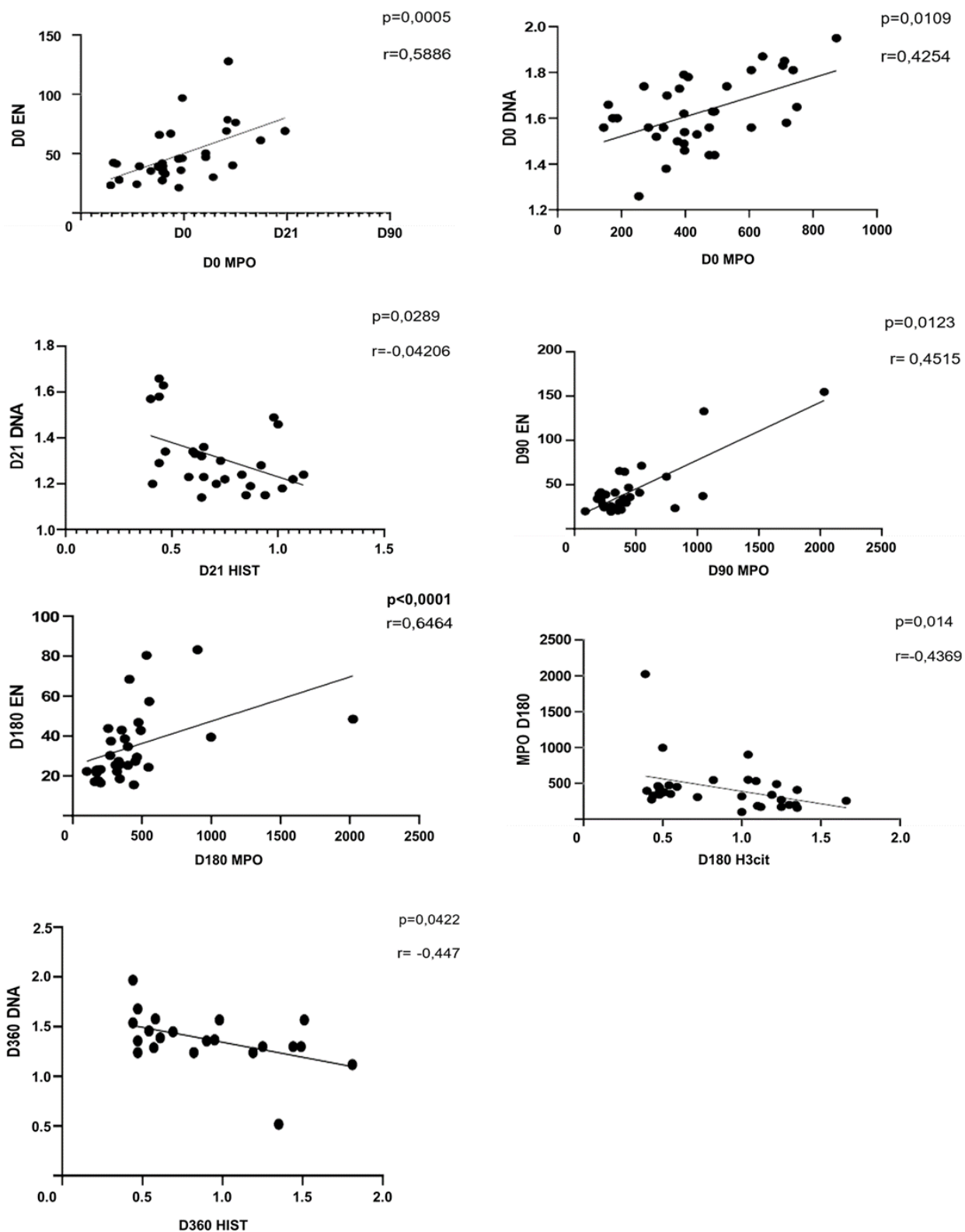


Legenda: (A) Concentração de mieloperoxidase (MPO, pg/mL); (B) Concentração de elastase neutrofílica (ng/mL); (C) Concentração de histona 3 citrulinada; (D) Concentração de DNA livre (ng/μL). Os valores estão representados pela mediana e intervalo interquartil. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para as comparações entre os dois grupos, em um determinado período de tempo. Fonte: Autor (2025).

## 5.7 Análises de correlação entre os marcadores de NETs

Nas análises de correlação entre os marcadores de NETs quantificados (Figura 6), observou-se no período de D0 correlação positiva entre MPO X EN ( $p=0,0005$ ;  $r=0,5886$ ) e MPO X DNA ( $p=0,0109$ ;  $r=0,4254$ ). Já no período de D21, uma correlação negativa de H3cit x DNA livre ( $P=0,0289$ ;  $r=-0,04206$ ) foi observada. No período de D90, uma correlação positiva foi observada entre MPO X EN ( $p=0,0123$ ;  $r=0,4515$ ). No período de D180, uma correlação positiva entre MPO X EN ( $p<0,0001$ ;  $r=0,6464$ ) e uma correlação negativa entre MPO X H3cit ( $p=0,014$ ;  $r=-0,4369$ ) foram observadas. Por fim, no período de D360 uma correlação negativa entre H3cit X DNA livre ( $p=0,0422$ ;  $r=-0,447$ ) foi observada.

Figura 6. Análises de correlação entre marcadores de NETs nas pacientes infectadas por CHIKV.



Legenda: Teste de correlação de Spearman.  
Fonte: Autor (2025).

## 6 DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) tem se mostrado com uma relevância nos problemas de saúde pública, especialmente nos países tropicais, devido às suas manifestações clínicas recorrentes e ao impacto funcional em indivíduos acometidos (Santos *et al.*,2024).

Este estudo teve um objetivo de investigação do papel das NETs (Armadilhas extracelulares de neutrófilos) na imunopatogênese da infecção por CHIKV, com o foco na análise de presença e variação temporal dos marcadores plasmáticos que são associados a NETs em mulheres infectadas. Essa proposta se baseia na hipótese de que a resposta inflamatória exacerbada induzida pela CHIKV pode ter uma correlação a essa liberação desregulada de NETs contribuindo para o prolongamento dos sintomas inflamatórios e para o desenvolvimento de quadros crônicos como a artralgia.

As NETs (Armadilhas extracelulares de neutrófilos), são estruturas formadas por redes de DNA extracelular associado com as proteínas antimicrobianas como mieloperoxidase (MPO) e a elastase de neutrófilos (NE). Elas representam um mecanismo de defesa essencial na destruição dos patógenos, incluindo os vírus. No entanto, sua liberação excessiva ou persistente pode contribuir para o dano do tecido e manutenção de estados inflamatórios crônicos (Dabrowska *et al.*,2016). Embora a literatura descreva que a participação das NETs em algumas infecções virais como dengue, zika e COVID-19, poucos estudos exploram sua contribuição na infecção pelo CHIKV. Considerando-se que a CHIKV pode causar inflamações duradouras e sequelas nos pacientes, tornando pertinente a investigação das NETs na atividade desse processo.

A avaliação temporal dos marcadores de NETs em pontos diferentes no contexto clínico da infecção permite compreender melhor os momentos críticos de ativação neutrofílica e liberação dessas estruturas. A análise em tempos distintos (D0, D21, D90, D180 e D360) possibilita identificar se há persistência ou resolução dos processos inflamatórios mediados pelas NETs, o que pode ter implicações prognósticas e terapêuticas. A compreensão dessa trajetória pode ajudar a identificar alvos para intervenção precoce e sugerir biomarcadores de evolução clínica ou de risco para cronicidade. Assim, este estudo contribui para preencher uma lacuna no

conhecimento sobre a interação entre a resposta imune inata e a progressão da chikungunya.

A avaliação dos níveis plasmáticos de MPO e elastase de neutrófilos revelou um padrão dinâmico ao longo do tempo nas mulheres infectadas pelo vírus Chikungunya. Os dados demonstraram concentrações mais elevadas desses marcadores em D0, correspondendo ao período agudo da infecção, seguidas por uma redução gradual nos tempos subsequentes. Entretanto, observou-se que, mesmo em D180 e D360, os níveis de MPO e elastase ainda se encontravam detectáveis em parte das pacientes, indicando uma possível manutenção da ativação neutrofílica em fases mais tardias.

Essa persistência pode refletir a cronificação do processo inflamatório, com potencial contribuição das NETs na manutenção de sintomas como a dor crônica, frequentemente relatada na chikungunya pós-aguda.

Do ponto de vista imunopatológico, a permanência de níveis elevados de marcadores de NETs após a fase aguda sugere que o processo inflamatório iniciado durante a infecção viral pode não se resolver completamente em todos os indivíduos. As NETs, quando não adequadamente depuradas, podem estimular a produção de citocinas inflamatórias, promover dano tecidual e agravar a resposta inflamatória, atuando como elementos perpetuadores da inflamação (Brinkmann *et al.*, 2004). Esse fenômeno já foi descrito em outras condições virais e autoimunes, reforçando a plausibilidade de sua participação na fisiopatologia da chikungunya, especialmente nos casos que evoluem com manifestações reumatológicas prolongadas.

Estudos prévios corroboram esses achados, como os realizados em pacientes com dengue, nos quais níveis aumentados de elastase e MPO foram associados à severidade da doença e ao aumento da permeabilidade vascular (Opasawatchai *et al.*, 2019). De forma semelhante, na COVID-19, a presença de NETs tem sido implicada na formação de microtrombos e em complicações pulmonares (ZUO *et al.*, 2020). Ainda que haja escassez de estudos específicos sobre NETs em chikungunya, os dados do presente trabalho somam-se à literatura crescente que aponta para um papel relevante dessas estruturas em infecções virais. Assim, os resultados obtidos reforçam a importância de se considerar as NETs não apenas como um marcador de fase aguda, mas também como um possível alvo terapêutico em casos com inflamação persistente.

A avaliação dos subgrupos de pacientes com e sem comorbidades, dor crônica ou uso de medicamentos não mostrou variações estatisticamente relevantes nos níveis de MPO e elastase. Essa falta de diferenças pode ser atribuída a fatores imunológicos, como a complexidade da resposta inflamatória de cada indivíduo, além de fatores metodológicos, como o tamanho pequeno da amostra e a significativa diversidade clínica entre as participantes. A existência de variáveis não controladas, como duração da infecção, tipo de comorbidade e uso regular ou ocasional de medicamentos anti - inflamatórios ou imunomoduladores, pode ter atenuado os possíveis efeitos nos marcadores analisados. A variedade no perfil das pacientes, apesar de refletir a realidade clínica, dificulta a identificação de fatores específicos que afetam diretamente a produção de NETs.

Em relação à relação entre os marcadores MPO e elastase, os valores de rho obtidos foram baixos, sugerindo uma conexão fraca entre os dois elementos. Isso pode indicar que, apesar de ambos serem componentes das NETs, sua liberação ou estabilidade no plasma pode ocorrer de maneira parcialmente independente, sendo afetada por diferentes caminhos de ativação dos neutrófilos ou por mecanismos de depuração distintos. Ademais, a baixa correlação pode indicar a limitação de se utilizar apenas marcadores indiretos para inferir sobre NETose. Também deve-se levar em conta a possibilidade de multicolinearidade estatística e o efeito do número limitado de participantes em certos períodos de coleta, elementos que podem afetar a solidez das análises correlacionais.

Metodologicamente, optou-se pelo uso de plasma devido à sua conveniência e ao fato de que o material já está acessível no banco de amostras do projeto. Entretanto, é importante ressaltar que a presença de fibrinogênio no plasma pode afetar a quantificação de proteínas granulares, o que pode ser uma limitação do estudo. Ademais, a decisão de incluir somente mulheres teve como objetivo diminuir a variabilidade hormonal e imunológica entre os gêneros, porém resulta em uma limitação na aplicação dos resultados à população em geral. A falta de comparação com o grupo controle em relação à idade, uso de medicamentos ou presença de comorbidades também pode ter afetado os resultados, gerando vieses não controlados.

A predominância de mulheres com idades entre 50 e 59 anos na amostra é consistente com os dados epidemiológicos nacionais, que mostram que mulheres de meia-idade têm maior probabilidade de apresentar infecção sintomática e

desenvolver dor articular crônica. Logo, essa faixa etária constitui um segmento da população que procura mais frequentemente o atendimento ambulatorial, o que pode ter contribuído para sua maior inclusão no estudo. Assim, os resultados retratam o perfil verdadeiro dos atendimentos em situações pós-surto e estão de acordo com outros estudos realizados no Brasil e em países onde o CHIKV é endêmico.

Os dados coletados nesta pesquisa ajudam a entender o papel das NETs na imunopatogênese da chikungunya, particularmente em casos de inflamação persistente. A detecção contínua de marcadores como MPO e elastase, mesmo meses depois da infecção aguda, sugere que as NETs podem estar implicadas na persistência da dor crônica, possivelmente ao causar danos aos tecidos e manter a inflamação local. Embora ainda não tenha sido comprovada, essa hipótese merece uma investigação mais detalhada com modelos funcionais.

Pode-se destacar o único e exclusivamente estudo de Hiroki (2020) a respeito das NETs relacionadas a CHIKV, esses resultados mostram que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) desempenham um papel crucial na resposta imune inata contra o vírus. Foram feitas uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo*, e foi possível estabelecer que neutrófilos de camundongos e humanos liberam as NETs em resposta a infecção por CHIKV, através de um mecanismo dependente da ativação do receptor de toll-like (TLR7) e da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse processo, chamado de NETose, demonstrou-se bem específico para o CHIKV, logo que outros arbovírus, como a zika (ZIKV) e Dengue (DENV), não induziram a mesma resposta sob condições experimentais semelhantes. A especificidade sugere que características moleculares únicas do CHIKV, relacionado à sua estrutura de RNA de fita simples, são reconhecidas pelo TLR7, sofrendo uma possível cascata de sinalização intracelular que resulta na liberação das NETs.

Essa confirmação da NETose não lítica como esse mecanismo na infecção por CHIKV é relevante, pois indica que os neutrófilos mantêm sua viabilidade celular enquanto exercem sua função antiviral, diferente do que ocorre em outras infecções onde a NETose lítica pode levar a morte celular e à exagerada inflamação tecidual. A capacidade das NETs de capturar e fazer a neutralização de partículas virais foi vista no experimento *in vitro*, onde a pré-incubação do CHIKV com as NETs resultou em redução significativa da infectividade, um efeito que foi revertido com o tratamento

com DNase. Essa observação ajuda na ideia de que as NETs atuam fisicamente na contenção viral, impedindo a disseminação do patógeno.

A relevância vista no estudo de Hiroki (2020), foi confirmada no experimento in vivo em camundongos IFNAR<sup>-/-</sup>, altamente susceptíveis à infecção por CHIKV. Com o tratamento feito com DNase resultou no aumento precoce da carga viral, prolongamento da viremia e a maior mortalidade, evidenciando o papel protetor das NETs no controle da replicação viral sistêmica. Essa detecção dos níveis elevados de complexos MPO-DNA no soro de pacientes com infecção aguda por CHIKV, correlaciona-se positivamente com a carga viral e reforça a eficácia dos achados e sugere que as NETs são um componente ativo da resposta imune humana contra o vírus.

Juntamente, estes resultados não apenas elucidam um novo mecanismo de defesa contra o CHIKV, mas também abrem perspectivas para intervenções terapêuticas que modulam a liberação da NETs, potencialmente incentivando a progressão para formas crônicas da doença. A desregulação na formação de NETs, no entanto, pode também contribuir para a patogênese da artralgia crônica característica da chikungunya, um aspecto que merece investigação futura. Assim, este estudo posiciona as NETs como um elemento fundamental na imunidade antiviral inicial, destacando sua dualidade como mediadoras de proteção e possíveis agentes de dano tecidual em contextos de desregulação imune.

Entre as principais limitações deste estudo, estão a falta de pareamento entre os grupos, o uso de dados autodeclarados sobre medicamentos, o número reduzido de participantes em determinados momentos e a utilização exclusiva de marcadores indiretos de NETs. Essas restrições afetam a habilidade de generalizar os resultados e a identificação precisa de mecanismos causais. A análise longitudinal individual também foi dificultada pela falta de dosagens seriadas em todos os participantes.

Para pesquisas futuras, sugere-se a implementação de métodos que possibilitem a distinção entre NETose lítica e vital, bem como a incorporação de técnicas funcionais, como a imunofluorescência, para a detecção direta de NETs. Para aumentar a validade dos resultados, é preciso ampliar a amostra, incluir homens e emparelhar adequadamente com os controles. Ademais, a consideração de NETs como biomarcadores de inflamação persistente ou como alvos terapêuticos pode abrir novos caminhos no tratamento clínico da chikungunya crônica.

## 7 CONCLUSÃO

Os achados desta dissertação permitem inferir que a infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) mobiliza de forma significativa e sustentada a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), conforme atestado pela quantificação sequencial dos biomarcadores MPO, elastase neutrofílica, histona H3 citrulinada e DNA livre no plasma de pacientes infectadas. A análise temporal demonstrou um pico de atividade neutrofílica na fase aguda (D0), com declínio subsequente, porém com níveis residualmente elevados até o 360º dia de acompanhamento, sugerindo uma ativação imunológica prolongada e possivelmente mal regulada.

A correlação positiva entre MPO e elastase neutrofílica em múltiplos intervalos temporais (D0, D90 e D180) indica uma coordenação na liberação desses componentes granulares durante a NETose, reforçando a relevância fisiopatológica desse mecanismo na infecção. A manutenção de níveis detectáveis de H3cit, em contraste com o grupo controle, corrobora a ocorrência de citrulinação de histonas — um evento molecular central na formação de NETs — mesmo em fases tardias da doença.

A ausência de associação significativa entre os níveis dos marcadores de NETs e variáveis clínicas como dor crônica, comorbidades ou uso de medicamentos pode refletir a complexidade da regulação imune inata e a influência de fatores individuais não capturados no desenho experimental. Não obstante, a persistência do perfil inflamatório neutrofílico sugere que as NETs possam atuar como mediadoras de dano tecidual e inflamação sustentada, contribuindo para a artralgia crônica característica da chikungunya.

Este trabalho fornece evidências robustas sobre o envolvimento das NETs na imunopatogênese da infecção por CHIKV, destacando seu duplo papel: como efetoras da resposta antiviral inicial e como potencialmente patogênicas na cronificação da doença. Os resultados abrem perspectivas para investigações futuras que explorem as NETs como alvos terapêuticos ou biomarcadores de prognóstico, visando intervir de modo mais preciso na modulação da resposta imune e na prevenção das sequelas a longo prazo associadas a essa arbovirose.

## REFERÊNCIAS

- AMULIC, B. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 459-489, 2012. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
- ANDRADE, F. F. D.; PENAFORTE, C. L.; VELOSO, C. A. Mecanismos moleculares de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos e seu papel na imunidade inata. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 23, n. 2, p. 03-08, 2016.
- ANDREI, G.; DE CLERCQ, E. Abordagens moleculares para o tratamento de infecções pelo vírus da febre hemorrágica. **Antiviral Res.**, v. 22, n. 1, p. 45–75, 1993.
- ARATANI, Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 640, p. 47-52, 2018.
- ARGIBAY, H. D. *et al.* High-resolution spatiotemporal analysis of chikungunya epidemics between 2019 and 2020 in Salvador, Brazil: a municipality-level transmission dynamics study. **Lancet Reg. Health–Am.**, v. 43, 2025.
- AZEVEDO, R. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk for Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 49, p. 58, 2015.
- BARDAGI, A. A. *et al.* Neutrófilos, leptina e câncer: uma revisão atualizada de suas relações. **Disciplinarum Sci., Saúde**, v. 22, n. 1, p. 185-201, 2021.
- BEITER, K. *et al.* An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. **Curr. Biol.**, v. 16, n. 4, p. 401–407, 2006.
- BENDER, A. T. *et al.* TLR7 and TLR8 differentially activate the IRF and NF-κB pathways in specific cell types to promote inflammation. **ImmunoHorizons**, v. 4, p. 93–107, 2020.
- BERENDS, E. T. *et al.* Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **J. Innate Immun.**, v. 2, n. 6, p. 576–586, 2010.
- BOELTZ, S. *et al.* To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ.**, v. 26, n. 3, p. 395–408, 2019.
- BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BROWN, R. S.; WAN, J. J.; KIELIAN, M. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 89, 2018.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, v. 379, p. 662–671, 2012.

CAGLIOTI, C. *et al.* Infecção pelo vírus Chikungunya: uma visão geral. **New Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 211–227, 2013.

CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 290, 2014.

CHOW, A. *et al.* Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

COUDERC, T. *et al.* A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.

CUCUNAWANGSIH, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to the disease severity of dengue virus infection. **J. Arthropod-Borne Dis.**, v. 18, n. 2, p. 172, 2024.

DAŁBROWSKA, D. *et al.* New aspects of the biology of neutrophil extracellular traps. **Scand. J. Immunol.**, v. 84, n. 6, p. 317–322, 2016.

BUHR, N.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. Como as armadilhas extracelulares de neutrófilos se tornam visíveis. **J. Immunol. Res.**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

DELGADO-RIZO, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 81, 2017.

DUIJL-RICHTER, V. *et al.* Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 2015.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. *et al.* Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.

FONTOURA, M. A.; ROCHA, R. F.; MARQUES, R. E. Neutrophil recruitment and participation in severe diseases caused by flavivirus infection. **Life**, v. 11, n. 7, p. 717, 2021.

FUCHS, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 36, p. 15880–15885, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1005743107.

GARDNER, J. *et al.* Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. **J. Virol.**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 2010.

GARISHAH, F. M. *et al.* Neutrophil extracellular traps in dengue are mainly generated NOX-independently. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 629167, 2021.

GARISHAH, F. M. *et al.* Neutrophil extracellular traps in dengue are mainly generated NOX-independently. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 629167, 2021.

- GASQUE, P.; JAFFAR-BANDJEE, M. C. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. **J. Infect.**, v. 71, p. 413–421, 2015.
- GAVILLET, M. *et al.* Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. **Am. J. Hematol.**, v. 90, n. 12, p. 1155–1158, 2015.
- GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. Uma revisão sobre artralgia induzida pelo vírus chikungunya: manifestações clínicas, terapêutica e patogênese. **Open Rheumatol. J.**, v. 10, p. 129–140, 2016.
- GRABENSTEIN, J. D.; TOMAR, A. S. Global geotemporal distribution of chikungunya disease, 2011–2022. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 54, p. 102603, 2023.
- GRIFFITH, M. E.; COULTHART, A.; PUSEY, C. D. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 103, n. 2, p. 253–258, 1996.
- HIROKI, C. H. *et al.* Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. **Front. Immunol.**, v. 10, p. 3108, 2020.
- HOARAU, J. J. *et al.* Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J. Immunol.**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.
- HONÓRIO, N. A. *et al.* The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, p. 1203–1214, 2009.
- JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol.**, v. 4, n. 7, p. 837–856, 2009.
- KARGAPOLOVA, Y. *et al.* The enzymatic and non-enzymatic function of myeloperoxidase (MPO) in inflammatory communication. **Antioxidants**, v. 10, n. 562, 2021.
- KASPRZYCKA, W. *et al.* Métodos diretos e indiretos de avaliação do processo de NETose. **J. Pré-Clin. Clin. Res.**, 2019.
- KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Med. Sci. (Basel)**, v. 6, n. 2, p. 01–21, 2018. DOI: 10.3390/medsci6020033.
- KHONGWICHIT, S. *et al.* Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **J. Biomed. Sci.**, v. 28, p. 1–17, 2021.
- KIELIAN, M.; CHANEL-VOS, C.; LIAO, M. Alphavirus entry and membrane fusion. **Viruses**, 2010.

KOCH, M. S. *et al.* Aspectos gerais da mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: uma breve revisão. **Braz. J. Dev.**, v. 7, n. 3, 2021.

LANDE, R. *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. **Sci. Transl. Med.**, v. 3, n. 73, p. 73ra19, 2011.

LEPPKES, M. *et al.* Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. **EBioMedicine**, v. 58, p. 102925, 2020. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102925.

LIMA NETO, A. S. *et al.* Chikungunya mortes atribuíveis: um resultado negligenciado de uma doença negligenciada. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 9, p. e0007575, 2019.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, p. 33–57, 1955. DOI: 10.1016/0035-9203(55)90081-X.

MASUDA, S. *et al.* NETosis markers: quest for specific, objective, and quantitative markers. **Clin. Chim. Acta**, v. 459, p. 89–93, 2016.

MIDDLETON, E. A. *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Blood**, v. 136, n. 10, p. 1169–1179, 2020.

MOIANA, M.; ARANDA, F.; DE LARRAÑAGA, G. A focus on the roles of histones in health and diseases. **Clin. Biochem.**, v. 94, p. 12–19, 2021.

MONTICOLO, F. *et al.* The role of DNA in the extracellular environment: a focus on NETs, RETs and biofilms. **Front. Plant Sci.**, v. 11, n. 589837, 2020.

MURALIDHARAN, A.; REID, S. P. Complex roles of neutrophils during arboviral infections. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1324, 2021.

MUSTAFA, M. S. *et al.* Descoberta do quinto sorotipo do vírus da dengue (DENV-5): um novo dilema de saúde pública no controle da dengue. **Med. J. Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NACCACHE, P. H.; FERNANDES, M. J. G. Challenges in the characterization of neutrophil extracellular traps: the truth is in the details. **Eur. J. Immunol.**, v. 46, n. 1, p. 52–55, 2016.

NAGLER, M. *et al.* Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 102, n. 15, p. 6343–6356, 2018.

PANDA, D. *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies SEC61A and VCP as conserved regulators of Sindbis virus entry. **Cell Rep.**, v. 5, n. 6, p. 1737–1748, 2013.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease.

**Nat. Rev. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 134–147, 2018. DOI: 10.1038/nri.2017.105.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008.

PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 135, p. 846–855, 2015. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.039.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 88, p. 2363–2377, 2007.

ROSE, P. P. *et al.* Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for Sindbis virus in both insect and mammalian hosts. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 2, p. 97–104, 2011.

RYDZYNSKA, Z. *et al.* Neutrophil elastase defects in congenital neutropenia. **Front. Immunol.**, v. 12, n. 653932, 2021.

SAFFARZADEH, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32366, 2012.

SANTOS, R. S. *et al.* Peripheral nervous system is injured by neutrophil extracellular traps (NETs) elicited by nonstructural (NS) protein-1 from Zika virus. **FASEB J.**, v. 37, n. 9, p. e23126, 2023.

SANTOS, T. J. *et al.* Spatial and temporal dynamics of chikungunya incidence in Brazil and the impact of social vulnerability: a population-based and ecological study. **Dis.**, v. 12, n. 7, p. 135, 2024.

SCHÖNRICH, G.; RAFTERY, M. J. Neutrophil extracellular traps go viral. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 366, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00366.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J. Clin. Investig.**, 2017.

SØRENSEN, O. E.; BORREGAARD, N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. **J. Clin. Investig.**, v. 126, n. 5, p. 1612–1620, 2016.

SOUMAHORO, M. K. *et al.* Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7800, 2009.

SOUZA, W. M. *et al.* Spatial-temporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil. **medRxiv**, p. 2022.08.03.22278339, 2022.

SOUZA, W. M. *et al.* Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. **Lancet Microbe**, v. 4, n. 5, p. e319–e329, 2023.

STOJKOV, D. *et al.* Physiological and pathophysiological roles of metabolic pathways for NET formation and other neutrophil functions. **Front. Immunol.**, v. 13, p. 826515, 2022.

TAN, C.; AZIZ, M.; WANG, P. The vitals of NETs. **J. Leukoc. Biol.**, v. 110, n. 4, p. 797–808, 2021.

TANG, B. L. The cell biology of Chikungunya virus infection. **Cell. Microbiol.**, v. 14, n. 9, p. 1354–1363, set. 2012. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01825.x.

URBAN, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cell. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 668–676, 2006.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.

VOYNOW, J. A.; SHINBASHI, M. Neutrophil elastase and chronic lung disease. **Biomolecules**, v. 11, n. 1065, 2021.

WANG, Y. *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **J. Cell Biol.**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200806072.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: história evolutiva e propagação recente da epidemia. **Antivir. Res.**, v. 120, p. 32–39, 2015.

WEBER, W. C. *et al.* The approved live-attenuated chikungunya virus vaccine (IXCHIQ®) elicits cross-neutralizing antibody breadth extending to multiple arthritogenic alphaviruses similar to the antibody breadth following natural infection. **Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 893, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and severe dengue**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 29 maio 2025.

XU, J. *et al.* Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nat. Med.**, v. 15, n. 11, p. 1318–1321, 2009.

YAKOB, L. Predictable chikungunya infection dynamics in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 9, p. 1889, 2022.

YANG, H. *et al.* New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 302, 2016.

YIPP, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nat. Med.**, v. 18, n. 9, p. 1386–1393, 2012.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil Extracellular Traps (NETs): formation and implications. **Acta Biochim. Pol.**, v. 60, n. 3, p. 277–284, 2013.

ZHANG, R. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.

ZUO, Y. *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **J. Clin. Invest. Insight**, v. 9, n. 6, 2020.

**ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ PROPESQ - UFC

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação sobre o papel das NETs (neutrophil extracellular traps) na imunopatogênese da Dengue e Chikungunya

**Pesquisador:** JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 75466723.2.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 6.528.234

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, com coleta de informações sociodemográficas, dados clínicos e laboratoriais e análise de amostras biológicas coletadas nos anos de 2023 a 2025 de pacientes infectados por DENV e CHIKV (sorologia positiva para IgM/IgG). Serão incluídos no estudo 50 pacientes com dengue na fase aguda e 50 pacientes com Chikungunya na fase aguda da doença atendidos em centros médicos colaboradores do estudo. O grupo controle (indivíduos com sorologia negativa e ausência de sintomas) será composto por 50 indivíduos. Os critérios de elegibilidade do estudo serão pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, com sorologia IgM/IgG positiva para os vírus. Os critérios de exclusão adotados serão indivíduos com testes sorológicos inconclusivos, mulheres grávidas, pacientes transplantados, indivíduos em uso de imunossupressores e/ou em tratamento quimioterápico, e pacientes com outras infecções virais (hepatite, HIV, etc). As amostras serão coletadas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos participantes envolvidos, após aprovação pelo CEP. Amostras de 10 mL de sangue periférico serão coletadas dos indivíduos incluídos no estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a presença de marcadores de NETs durante infecção aguda por DENV e CHIKV e associá-los

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3368-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ PROPESQ - UFC



Continuação do Parecer: 6.528.234

ao prognóstico das doenças.

**Objetivo Secundário:**

-Descrever as características sociodemográficas e clínicas de pacientes infectados com DENV e CHIKV na fase aguda das doenças;

-Quantificar os marcadores de NETs (MPO, EN, histona citrulinada e DNA livre) em pacientes infectados por DENV e associá-los ao prognóstico da doença (gravidade e duração dos sintomas).

-Quantificar os marcadores de NETs (MPO, EN, histona citrulinada e DNA livre) em pacientes infectados por CHIKV na fase aguda e associá-los ao prognóstico da doença (cronicidade dos sintomas, desenvolvimento de artralgia).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos são mínimos para os participantes da pesquisa. Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Em caso de aparecimento de qualquer complicação, o indivíduo será assistido prontamente por equipe médica dos serviços de saúde envolvidos no estudo.

**Benefícios:**

Não haverá benefício direto dos indivíduos incluídos no estudo. No entanto, a participação no estudo poderá ajudar na compreensão da doença, beneficiando de forma indireta outros pacientes no futuro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto interessante, prospectivo e que pode auxiliar os pacientes com dengue e Chikungunya.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3386-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ PROPESQ - UFC



Continuação do Parecer: 6.528.234

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2193705.pdf	21/09/2023 14:57:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	21/09/2023 14:56:28	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PESQUISADORES.pdf	21/09/2023 14:23:14	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	21/09/2023 14:20:30	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	apresentacao.pdf	21/09/2023 14:19:36	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	21/09/2023 14:19:19	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DACT.pdf	21/09/2023 14:18:54	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	21/09/2023 14:11:09	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Brochura Pesquisa	BROCHURA.pdf	21/09/2023 14:11:01	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Folha de Rosto	ROSTO.pdf	21/09/2023 14:09:43	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 23 de Novembro de 2023

Assinado por:  
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3368-8344

E-mail: comepe@ufc.br